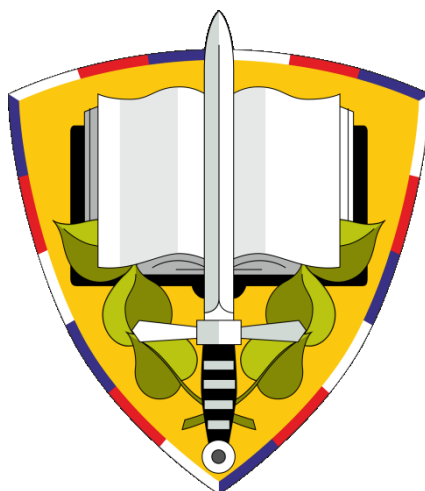


UNIVERZITA OBRANY
FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ

Doktorský studijní program TOXIKOLOGIE



DIZERTAČNÍ PRÁCE

Název: Predikce prostupu nových léčiv přes
hematoencefalickou bariéru

Zpracoval: Mgr. Tereza Kobrlová
Školitel: doc. PharmDr. Ondřej Soukup, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2020

Písemné zadání tématu disertační práce

Tereza Koblrová

Stanovení tématu disertační práce

Student/ka: Tereza Koblrová

Stanovené téma disertační práce: **Predikce postupu nových léčiv přes hematoencefalitickou bariéru.**

Klíčová slova v ČJ (5-10):

Hematoencefalická bariéra; buněčná linie; in vitro; dostupnost v mozku; léčivo; effluxní mechanismy

Klíčová slova v AJ (5-10):

Blood-brain barrier; cell lines; in vitro; bioavailability in brain; drug; efflux mechanisms

Stručná anotace disertační práce v ČJ (v rozsahu 5 řádků):

Cílem doktorské práce studenta bude vypracování a zavedení vhodné *in vitro* metodiky resp. metodik pro studování prostupu potenciálních léčiv přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Léčiva dostupná v CNS jsou klíčová z pohledu terapie otrav organofosfáty. Dále se student bude zabývat možnostmi ovlivnění tohoto prostupu ve smyslu zvýšení dostupnosti léčiva v CNS. Pro studium predikce prostupu přes HEB bude vybrána vhodná metodika na bázi buněčných linií (např. MDCK), které byly popsány jakou vhodnou pro toto studium. Dále bude vytipována metodika umožňující studium aktivních transportérů a efluxních mechanismů na bázi buněčných linií exprimujících tyto transportéry. Těžiště práce leží v oblasti *in vitro*, avšak bude snaha o rozšíření práce na analytickou a *in vivo* část

Stručná anotace disertační práce v AJ (v rozsahu 5 řádků):

The aim of the PhD student's work will be the development and introduction of appropriate *in vitro* methodology for studying the penetration of potential drugs across the blood brain barrier (BBB). Pharmaceuticals available in the CNS are crucial in terms of therapy organophosphorous poisoning. Student will examine the possibilities of influencing this crossing in the sense of increasing the availability of the drugs in the CNS. To study the permeability through the BBB appropriate methods based on cell lines (e.g. MDCK), will be established. Also a suitable method enabling the study of active transporters and drug efflux mechanisms based on cell lines expressing these transporters will be established. The main work is located in the *in vitro* level, however there will be an attempt to expand the scope to the analytical part and the *in vivo* examination

Stanovisko oborové rady:

Souhlasím – ~~nesouhlasím~~*/ se stanoveným tématem disertační práce.

25. 11. 2016

datum

Tereza Koblrová
předseda oborové rady

Schvaluji.

1. 12. 2016

datum

děkan

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému školiteli doc. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D. za odborné vedení celého mého postgraduálního studia.

Dále děkuji všem, kteří se na mé práci podíleli. Prof. Yevgenovi Karpichevovi z University of Technology, Tallin, Estonsko za spolupráci a syntézu nanodiamantových částic, pplk. doc. PharmDr. Janě Žďárové Karasové Ph.D. z Katedry toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany za *in vivo* část práce, kolektivu z Katedry farmacie a toxikologie, Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy za uvedení do problematiky buněčných modelů a transportérů.

Rovněž děkuji kolegům z Centra biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové a z Katedry toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany.

V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého mého studia.

Poděkování grantové a institucionální podpoře

- Specifický vysokoškolský výzkum, MŠMT ČR (SV/FVZ201708) - projekt s názvem „Vývoj a validace metodiky pro *in vitro* predikci prostupu nových potenciálních léčiv přes hematoencefalitickou bariéru pomocí MDCK buněčných linií“ – hlavní řešitel, úspěšně obhájeno.
- Agentura pro zdravotnický výzkum, MZ ČR (17-32801A) – projekt s názvem „Centrálně účinná antidota pro léčbu otrav organofosfáty“ – člen týmu, projekt je v současné době řešen.
- Agentura pro zdravotnický výzkum, MZ ČR (15-31847A) – projekt s názvem „Vývoj nových dezinfekčních činidel proti patogenům vyskytujících se v nemocničním prostředí“ – člen týmu, úspěšně obhájeno.
- Dlouhodobý záměr rozvoje organizace ZHN FVZ UO
- Institucionální podpora FNHK MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906)

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracovala pod vedením školitele samostatně za využití uvedených zdrojů. Dále prohlašuji, že práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 11.12.2020

Mgr. Tereza Koblrová

.....

Abstrakt a klíčová slova

V předkládané dizertační práci byla řešena problematika nedostatečného prostupu antidot otrav organofosforovými sloučeninami. V rámci práce byly vzájemně porovnány nové metody pro hodnocení schopnosti látek prostupovat do centrálního nervového systému (CNS). Tyto metody byly následně využity pro testování standardních i nově syntetizovaných potenciálních léčiv z této skupiny. Dále byly zkoumány způsoby, které by mohly přístup do CNS zlepšit.

Vysoce toxické organofosforové sloučeniny jsou považovány za jedny z nejnebezpečnějších vojensky zneužitelných látek. Tyto sloučeniny inhibují enzym acetylcholinesterázu, čímž narušují cholinergní přenos v zasaženém organismu a z tohoto důvodu jsou označovány jako nervově paralytické látky (NPL). Vysoká nebezpečnost NPL spočívá v jejich relativně snadné dostupnosti, vysoké toxicitě a nedostatečně účinné terapii. Jednou z hlavních překážek léčby těchto otrav je neschopnost reaktivátorů acetylcholinesterázy obnovující činnost inhibovaného enzymu prostoupit v terapeutické koncentraci do CNS.

Výzkum a vývoj nově syntetizovaných potenciálních léčiv vyžaduje pro posouzení jejich biologických vlastností vhodné *in vitro* metody. První část experimentální práce byla věnována vývoji a validaci nových metod pro posouzení penetrace látek hematoencefalickou bariérou (HEB), včetně jejich vzájemného srovnání. Bariérový model PAMPA umožňuje hodnocení prostupu látek přes membránu simulující HEB pouze na základě fyzikálně-chemických vlastností jakožto určujícího předpokladu k pasivní difúzi. Fosfolipidová membrána metody PAMPA byla u dalšího modelu nahrazena monovrstvou buněčných kultur, a tím byl model obohacen o aktivní děje přítomné v živých buňkách. Testováním standardních látek byl při srovnání PAMPA a buněčných modelů zjištěn pozitivní posun v korelaci naměřených výsledků s reálnou dostupností jednotlivých léčiv v CNS. Nejlepší korelaci poskytla metoda využívající hCMEC/D3 buněčnou linii humánního původu, u které predikce prostupu látek HEB na základě zjištěných výsledků plně odpovídala situaci *in vivo*.

Druhá část experimentální práce se zabývala způsoby zvýšení prostupu reaktivátorů acetylcholinesterázy do CNS. Validita vybraných způsobů byla ověřena metodami *in vitro* a *in vivo*. Testováním prostupu monokvartérních a nekvartérních reaktivátorů

bylo potvrzeno, že kvartérní dusík v jejich struktuře, důležitý z hlediska reaktivace enzymu, je zároveň zásadní překážkou v prostupu HEB. Využití diamantových nanočástic pozitivně ovlivnilo samotný vstup látek přes buněčnou monovrstvu. Cucurbit[7]urilové nanočástice navázané na reaktivátor HI-6 zlepšily jeho farmakokinetické vlastnosti, zejména celkovou dostupnost a prodloužily poločas eliminace z mozku u experimentálních zvířat. Pro posouzení interakce standardních reaktivátorů s P-glykoproteinem byl aplikován model využívající CACO-2 buněčnou linii, která exprimuje tento transportér zodpovědný za eflux řady léčiv z HEB zpět do krevního oběhu. Tato interakce nebyla, proti očekávání, u standardních reaktivátorů AChE uvedenou metodou potvrzena.

Zavedením těchto buněčných metod pro hodnocení prostupu látek HEB byl vytvořen komplexní nástroj, nejen pro testování nově syntetizovaných potenciálních antidot otrav NPL, ale i dalších látek interagujících se strukturami v CNS. Selektce látek pomocí *in vitro* metod redukuje využití experimentálních zvířat pouze pro látky s nejlepšími biologickými vlastnostmi, což vede také ke snížení nákladů na výzkum.

Klíčová slova: hematoencefalická bariéra, buněčná linie, *in vitro*, dostupnost v mozku, efluxní mechanismy

Abstract and keywords

The dissertation thesis deals with problem of insufficient penetration of antidotes for treatment of organophosphorus poisonings. Methods for evaluating the ability of compounds to penetrate the central nervous system (CNS) were developed and compared to each other. These methods were subsequently used for the standard and newly synthesized potential drugs from this group to evaluate their penetration to the brain. Furthermore, the strategies that could improve CNS penetration were investigated.

Highly toxic organophosphorus compounds represent a big threat due to possible misuse in the military or for terrorist purposes. These compounds affecting cholinergic neurotransmission by inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE). For this reason, they are called nerve agents (NAs). NAs are extremely toxic, relatively easily obtainable and the therapy of intoxication is insufficiently effective. One of the major obstacles of AChE reactivators, causal antidote used in the treatment, is to overcome the blood-brain barrier in therapeutic concentration and restore the function of AChE in the CNS. Thus, research and development of new drug candidates for such antidotes requires appropriate methods for evaluation of their biological properties even *in the in vitro stage*.

Selection, validation and comparison of *in vitro* methods for evaluation blood-brain barrier (BBB) penetration was the first part of the experimental part. The PAMPA model predicts the permeation of compounds across the membrane and thus simulates BBB only on the base of physicochemical properties of compounds defining precondition to the passive diffusion. Next, the models in which the cellular membrane replaced the phospholipid membrane of PAMPA were used and by that the model was enriched with the activity of living cells. The standards drugs assessed by cellular models showed the better correlation between measured and real data of CNS availability when compared with PAMPA. The best correlation was achieved by a method using an hCMEC/D3 cell line of human origin, in which the prediction of BBB permeation fully corresponded to *in vivo* situation

The second part of the experimental work dealt with the approaches to increase the penetration of AChE reactivators into the CNS. The validity of the selected

approaches was verified by *in vitro* and *in vivo* methods. The evaluation of the permeation of monoquaternary and nonquaternary reactivators confirmed an important role of the quaternary nitrogen in their structure as a major obstacle in the permeation through the BBB. The use of diamond nanoparticles increased the permeation of compounds through the cell monolayer. HI-6 reactivator encapsulated in cucurbit[7]uril nanoparticles showed an improved pharmacokinetic profile by prolongation the elimination half-life from the brain in experimental animals, which resulted in overall higher bioavailability. The CACO-2 cell line was applied to assess the interaction of standard reactivators with P-glycoprotein. This model expresses this transporter, responsible for the efflux of a number of drugs from BBB back into the bloodstream. Such interaction was not confirmed for standard AChE reactivators by this method on contrary to expectations.

Thus, a complex *in vitro* tool was created by using these cellular methods for determination of the ability of newly synthesized potential antidotes for NA poisoning and for other substances targeting structures in the CNS to penetrate the BBB. The use of *in vitro* methods for the selection of hit compounds reduces the use of experimental animals and the costs of the research and development processes.

Keywords: blood-brain barrier, cell lines, *in vitro*, bioavailability in brain, drug, efflux mechanisms

Obsah

Písemné zadání tématu dizertační práce	2
Poděkování.....	3
Poděkování grantové podpoře.....	4
Čestné prohlášení	5
Abstrakt a klíčová slova.....	6
Abstract and keywords.....	8
Obsah	10
Seznam použitých zkratk	14
Seznam obrázků	17
Seznam tabulek	18
1. Úvod.....	19
1.1 Organofosforové inhibitory acetylcholinesterázy	19
1.1.1 Vývoj a historie zneužití NPL	20
1.1.2 Mechanismus účinku OFI	21
1.1.3 Klinická manifestace intoxikace OFI.....	23
1.1.4 Terapie otrav OFI.....	24
1.1.4.1 Reaktivátory acetylcholinesterázy	25
1.2 Hematoencefalická bariéra a prostup reaktivátorů do CNS	25
1.2.1 Využití nanočástic	27
1.2.2 Inhibice P-glykoproteinu.....	28
1.2.3 Zvýšení lipofility	29
1.2.4 Konjugace s cukry	30
1.2.5 Proléčiva.....	30
1.2.6 Nekvartérní reaktivátory	31
1.2.7 Intranasální podání	32
1.3 Metody pro posouzení CNS dostupnosti.....	33
1.3.1 <i>In vitro</i> metody pro posouzení CNS dostupnosti	33
1.3.1.1 Metody využívající buněčné kultury.....	34
2. Cíle práce	44

3.	Materiál a metodika.....	45
3.1	Testované látky	45
3.2	Použité metody.....	49
3.2.1	PAMPA model.....	49
3.2.1.1	Pracovní postup.....	49
3.2.2	MDCK buněčný model	50
3.2.2.1	Buněčná linie:	50
3.2.2.2	Pracovní postup:	51
3.2.3	D3 buněčný model	53
3.2.3.1	Buněčná linie:	53
3.2.3.2	Pracovní postup:	53
3.2.4	CACO-2 buněčný model.....	54
3.2.4.1	Buněčná linie:	54
3.2.4.2	Pracovní postup:	55
3.2.5	<i>In vivo</i> farmakokinetické studie	56
3.2.5.1	Stanovení nově syntetizovaných reaktivátorů <i>in vivo</i>	56
3.2.5.2	<i>In vivo</i> stanovení penetrace HI-6@CB[7] do mozku	58
3.2.6	Analýza dat.....	59
3.2.6.1	Výpočet P_e pro model PAMPA.....	59
3.2.6.2	Výpočet Papp pro buněčné modely	60
3.2.6.3	Měření TEER.....	60
3.2.6.4	Výpočet transportního poměru pro posouzení interakce s P-glykoproteinem na CACO-2 buněčném modelu.....	61
3.2.7	Statistická analýza.....	61
4.	Výsledky	62
4.1	Modely pro predikci penetrace látek přes hematoencefalickou bariéru <i>in vitro</i> .	62
4.1.1	PAMPA model.....	62

4.1.1.1	Validace a testování standardních látek	62
4.1.1.2	Korelace logD s koeficientem Pe	64
4.1.2	MDCK buněčný model	65
4.1.2.1	Validace MDCK metody a testování standardních látek	65
4.1.2.2	Korelace logD s koeficientem Pe	68
4.1.3	Korelace mezi PAMPA a MDCK metodou	69
4.1.4	D3 buněčný model	71
4.1.5	Porovnání <i>in vitro</i> modelů pro predikci CNS dostupnosti	73
4.2	Testování <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> prostupu standardních a nově syntetizovaných reaktivátorů	75
4.3	Přístupy pro zvýšení transportu reaktivátorů acetylcholinesterázy do mozku	77
4.3.1	CACO-2 metoda pro posouzení interakce reaktivátorů acetylcholinesterázy s P-glykoproteinem.....	77
4.3.1.1	Validace CACO-2 metody a testování standardních látek.....	77
4.3.2	Posouzení interakce standardních reaktivátorů acetylcholinesterázy s P-glykoproteinem.....	79
4.3.3	<i>In vitro</i> stanovení penetrace diamantových nanočástic	80
4.3.4	<i>In vivo</i> stanovení penetrace reaktivátorů acetylcholinesterázy do CNS navázaných na cucurbit[7]urilové nanočástice.....	81
5.	Diskuze.....	84
5.1	<i>In vitro</i> metody pro predikci průchodu látek do CNS	84
5.2	Možnosti zvýšení hladiny reaktivátorů acetylcholinesterázy v mozku	89
5.2.1	Testování standardních a nově syntetizovaných reaktivátorů acetylcholinesterázy	91
5.2.2	Posouzení interakce standardních reaktivátorů acetylcholinesterázy s P-glykoproteinem.....	92
5.3	Diamantové nanočástice jako nosiče zlepšující penetraci navázaných reaktivátorů acetylcholinesterázy do mozku	93
5.4	Využití cucurbit[7]urilových nanočástic pro zlepšení penetrace HI-6 do mozku	94
6.	Závěr	96
7.	Přínos práce	98
8.	Seznam použité literatury.....	99
9.	Příložené publikace	114

9.1	Seznam publikací k tématu dizertační práce	114
9.2	Seznam publikací nad rámec tématu dizertační práce.....	116

Seznam použitých zkratek

2-PAM	pralidoxim
AB	apikálně-basolaterální
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AUC	Plocha pod křivkou (Area Under the Curve)
BA	basolaterálně-apikální
BMECs	endoteliální buňky mozkových mikrokapilár (Brain Microvascular Endothelial Cells)
CB[7]	cucurbit[7]urilové nanočástice
CED	katetry zprostředkované podání (Convection Enhanced Delivery)
CFT	kumulativní množství (Cumulative Fraction Transported)
C _{max}	maximální koncentrace
CNS	centrální nervový systém (Central Nervous System)
DAM	diacetyl monooxim
DFP	diisopropyl fluorofosfát
DMEM	kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethyl sulfoxid
EMEM	kultivační médium Eagle's Minimum Essential Medium
ESC	embryonální kmenové buňky (Embryonic Stem Cells)
FBS	fetální bovinní sérum (Fetal Bovine Serum)
FGF	fibroblastový růstový faktor (Fibroblast Growth Factor)
FITC-dextran	fluorescenčně značený dextran (Fluorescein Isothiocyanate-Dextran)
GA	tabun
GABA	gama-aminomáselná kyselina
GB	sarin
GD	soman
GF	cyklosarin
Glu	kyselina glutamová
GLUT1	glukózový transportér 1
HEB	hematoencefalická bariéra
HI-6	asoxim

His	histidin
HSA NČ	nanočástice z lidského sérového albuminu (Human Serum Albumin)
I	inhibitor
i.m.	intramuskulární
i.v.	intravenózní
IAM	imobilizované umělé membrány (Immobilized Artificial Membranes)
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky (Induced Pluripotent Stem Cells)
LD ₅₀	střední smrtná dávka (Lethal Dose)
LY	lucifer yellow
MET	methoxim
MINA	isonitrosoaceton
MPO	víceparametrová optimalizace (Multiparameter Optimization)
NČ	nanočástice
NMDA	N-methyl D-aspartát
NPL	nervově paralytické látky
ot.	otáčky
OBI	obidoxim
OFI	organofosforové inhibitory
OP	organofosfáty
PAM	pralidoxim
PAMPA	zkouška umělého membránového pronikání (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)
pBCEC	primární endoteliální buňky prasečích mozkových kapilár (Primary Porcine Brain Capillary Endothelial Cells)
PBL	mozkový prasečí lipid (Polar Brain Lipid)
PEN-STREP	směs penicilinu a streptomycinu
Pgp	p-glykoprotein
POX	paraoxon
PSC	pluripotentní kmenové buňky (Pluripotent Stem Cells)
R123	Rhodamine 123
Ser	serin
SS	stříhové napětí (Shear Stress)
TEER	transendoteliální/transepiteliální odpor (Transendothelial/Transepithelial Electrical Resistance)
TF NČ	nanočástice z oxidu křemičitého obalené transferinem
TJs	těsná spojení (Tight Junctions)
TR	transportní poměr (Transport Ratio)

TRIM	trimedoxim
ZO-1	zonula okludens (Zonula Occludens)

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Nejvýznamnější nervově paralytické látky.....	20
Obrázek 2 – Mechanismus inhibice, dealkylace a reaktivace AChE.....	23
Obrázek 3 – Strategie pro překonání HEB.....	27
Obrázek 4 – Transwell s detailem jamky z vertikálního pohledu.....	35
Obrázek 5 – Ko-kultivace dvou (A) a tří (B) buněčných typů v transwellovém uspořádání.....	37
Obrázek 6 – Znázornění prostupu látek přes specifickou membránu v čase.....	39
Obrázek 7 – Destičky využívané pro metodu PAMPA (vlevo) a buněčné modely (vpravo).....	40
Obrázek 8 – Struktury standardních reaktivátorů HI-6, 2-PAM (pralidoxim), LüH-6 (obidoxim), MMB-4 (methoxim), TMB-4 (trimedoxim).....	46
Obrázek 9 – Struktury monokvartérních reaktivátorů.....	47
Obrázek 10 – Struktury nekvartérních reaktivátorů.....	48
Obrázek 11 – Diamantové nanočástice De-3 s navázaným reaktivátorem.....	49
Obrázek 12 – Cucurbit[7]urilové nanočástice.....	49
Obrázek 13 – Změna koncentrace donepezilu v akceptorovém a donorovém kompartmentu v čase.....	62
Obrázek 14 – Korelace logD a Pe pro jednotlivé standardní látky měřené metodou PAMPA... 65	65
Obrázek 15 - Nárůst koncentrace látek v akceptorovém kompartmentu v čase pro CNS+ (promazin) a CNS- (sulfasalazin) standardní látky.	66
Obrázek 16 – Korelace logD a Papp pro jednotlivé standardní látky.....	68
Obrázek 17 – Korelace mezi koeficienty Papp a Pe pro jednotlivé standardní látky.....	71
Obrázek 18 – Vývoj transendotheliálního odporu (TEER) měřeného v průběhu kultivace pro jednu destičku.....	78
Obrázek 19 – V grafu je znázorněno kumulativní množství (CFT, z ang. Cumulative Fraction Transported) R123 v μM stoupající v akceptorovém kompartmentu v čase pro oba směry.	78
Obrázek 20 – Hodnoty TR testovaných standardních oximových reaktivátorů (PAM = pralidoxim, OBI = obidoxim, TRIM = trimedoxim, MET = metoxim) s/bez inhibitoru verapamilu (I).....	79
Obrázek 21 – Stanovené koncentrace v $\text{ng} \times \text{mg}^{-1}$ HI-6 nevázané a HI-6@CB[7] v mozkové tkáni myši pro odběry v různých časových bodech.....	82
Obrázek 22 - Změny aktivity AChE ($\mu\text{kat} \times \text{l}^{-1}$) 60 min po intoxikaci sarinem v LD ₅₀ (144 $\mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$, i.m.) a podání HI-6 nevázané a HI-6@CB[7] (48 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$) s atropinem (10 $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$) v mozku myši (n=6).....	83

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Tabulka shrnující vybrané vlastnosti buněčných kultur MDCK, CACO-2 a hCMEC/D3.....	42
Tabulka 2 - Porovnání výsledků testování standardních látek metodou PAMPA <i>s in vivo</i> CNS dostupností klinicky užívaných léčiv.	63
Tabulka 3 – Porovnání výsledků testování standardních látek metodou MDCK <i>s in vivo</i> CNS dostupností klinicky užívaných léčiv	67
Tabulka 4 - Porovnání standardních látek testovaných pomocí PAMPA a MDCK modelu.	69
Tabulka 5 – Výsledky testování standardních látek metodou hCMEC/D3 <i>s in vivo</i> CNS dostupností klinicky užívaných léčiv u lidí a jejich klasifikace mezi CNS+ a CNS- dle hodnot koeficientů Papp.	72
Tabulka 6 – Porovnání koeficientů $Pe \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ pro PAMPA metodu, $Papp \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ pro buněčné modely, MDCK a D3.....	74
Tabulka 7 – Porovnání koeficientů Pe pro PAMPA metodu a $Papp$ MDCK pro standardní a nově syntetizované reaktivátory $\times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$	76
Tabulka 8 – Hodnoty $Papp$ koeficientů ve směru AB a ve směru BA s/bez inhibitoru pro testované látky jsou vyjádřeny jako průměr tří měření \pm SEM.	80
Tabulka 9 – Koeficienty $Papp$ pro různé koncentrace ($10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ a $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) De-3 nanočástic.	80
Tabulka 10 – Farmakokinetický parametr AUC (plocha pod křivkou) po podání ekvimolárního množství HI-6 nevázané a HI-6@CB[7].....	82

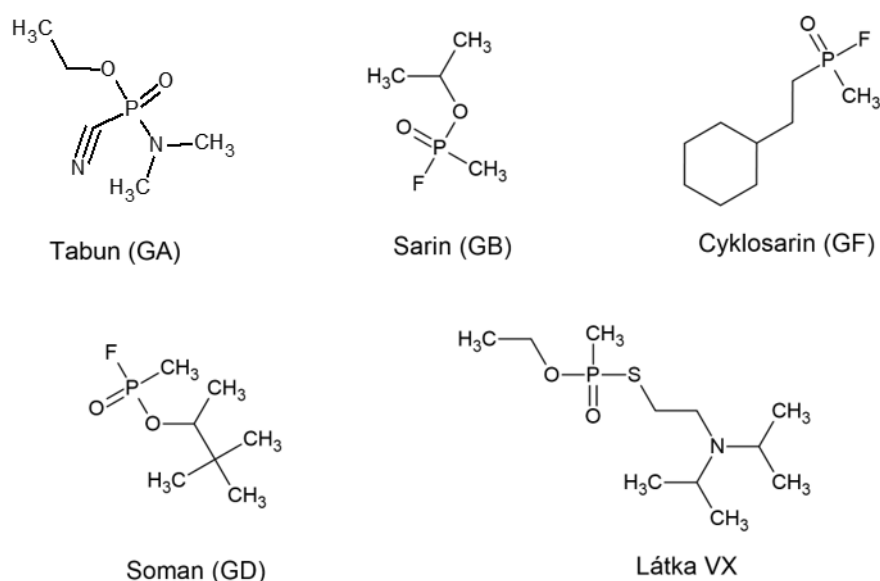
1. Úvod

Vysoce toxické organofosforové sloučeniny jsou na jedné straně hojně využívány v zemědělství jako pesticidy, na straně druhé jsou považovány za jednu z nejnebezpečnějších vojensky či teroristicky zneužitelných látek (King a Aaron 2015). Otravy těmito sloučeninami ovlivňujícími cholinergní přenos inhibicí enzymu acetylcholinesterázy (AChE) způsobují statisíce úmrtí ročně (Robb a Baker 2020). Jednou z největších překážek léčby intoxikací organofosfáty je nedostatečný účinek dostupných antidot v centrálním nervovém systému (CNS). Zatímco lipofilní organofosfáty překonávají hematoencefalickou bariéru snadno, oximové reaktivátory acetylcholinesterázy obnovující činnost tohoto enzymu prostupují do mozku pouze v minimální míře (Lorke et al. 2008). I přes dlouhotrvající celosvětový výzkum doposud nebylo nalezeno univerzální antidotum s dostatečnou účinností v CNS, které by zvrátilo trvalé následky způsobené poškozením struktur v mozku, které mohou být i smrtelné. Z tohoto důvodu je výzkum antidot stále aktuální a jsou hledány nové sloučeniny schopné eliminovat následky otrav organofosfáty. Vzhledem k tomu, že dostupnost v CNS je validována až na úrovni *in vivo* studií, které jsou prováděny v pokročilé fázi výzkumu, je nezbytné mít k dispozici metody, které dostupnost v mozku predikují již během *in vitro* fázi vývoje léčiva.

1.1 Organofosforové inhibitory acetylcholinesterázy

K organofosforovým inhibitorům (organofosfáty, OFI) AChE řadíme organofosfáty, organofosfonáty a fosforamidáty. Organofosfáty jsou běžně využívány v průmyslu, kde slouží např. jako změkčovadla, aditiva a hydraulické kapaliny či v medicíně jako veterinární i humánní léčiva. Své nejrozsáhlejší uplatnění našly sloučeniny tohoto typu jako pesticidy v zemědělství (např. paraoxon, malathion, dichlorvos). Díky svým vlastnostem, mezi něž patří vysoká toxicita vůči cílovému organismu, relativně nízká stabilita v životním prostředí a v neposlední řadě finanční dostupnost, se staly velmi využívanou skupinou nahrazující dříve používané látky, např. DDT (King a Aaron 2015). Následkem otrav pesticidy na druhou stranu umírá každoročně kolem 300 000 lidí, především v rozvojových zemích (Robb a Baker 2020). Důvodem je jejich časté zneužívání k sebevražedným účelům, ale i vysoká toxicita, nedostatek ochranných pomůcek a nedostatečně účinná terapie. Vysoce toxické deriváty

fosforu se řadí do skupiny nervově paralytických látek (NPL). NPL jsou nejvýznamnější a nejnebezpečnější skupinou bojových chemických látek, jejichž chemické struktury jsou uvedeny na Obrázek 1. Svými vlastnostmi ideálně splňují požadavky pro použití v chemických zbraních, mají vysokou toxicitu vůči savcům, rychlý nástup účinku a pronikají do organismu prakticky všemi branami vstupu. Navíc jejich syntéza je relativně snadná a levná, a proto jsou považovány za nebezpečné a snadno zneužitelné v chemických zbraních (Patočka 2004). Nebezpečí jejich zneužití ve válce nebo jako prostředků terorizmu je celosvětově stále aktuální (King a Aaron 2015).



Obrázek 1 – Nejvýznamnější nervově paralytické látky

1.1.1 Vývoj a historie zneužití NPL

Vývoj NPL odstartoval při výzkumu nových potenciálních organosfátových insekticidů již ve třicátých letech dvacátého století, kdy německý chemik Gerhard Schrader popsal tabun (Holmstedt 1963). Následně byly vyvinuty další NPL tzv. G-látky (sarin a soman) a po druhé světové válce také látka VX, která se nyní řadí mezi tzv. V-látky (Ghosh a Newman 1955). V posledních letech velmi diskutovanou skupinou NPL jsou tzv. novičky, které byly syntetizovány v Rusku (Zoltani 2009). Látky z této skupiny jsou považovány za extrémně toxické, vysoce stabilní, špatně detekovatelné běžně používanými metodami a jimi inhibovaná AChE pravděpodobně

nereaktivovatelná dostupnými antidoty. Byly navrženy jako binární směsi, které získávají své toxické vlastnosti až po smísení jejich prekurzorů (Jeong a Choi 2019).

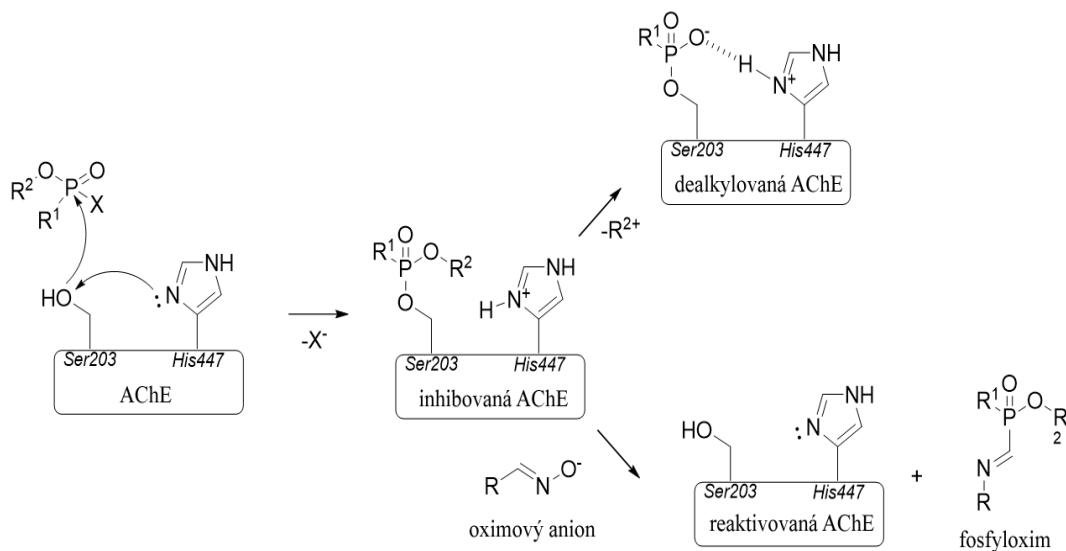
V historii je známo mnoho případů zneužití NPL jako chemických zbraní při válečných konfliktech či teroristických útocích. V 80. letech 20. století byly NPL použity v Íránsko-Írácké válce proti iránským vojskům a kurdské populaci v severním Íráku (Riley 2003). V roce 1995 byl sarin zneužit Japonským kultem Óm šinrikjó ve městě Matsumoto a v Tokijském metru. Zemřely desítky lidí a další tisíce byly zasaženy (Yanagisawa et al. 1995; Nagao et al. 1997). Jako reakce na útoky byla ustanovena v roce 1997 tzv. Chemical Weapons Convention, která zakazuje skladování, užívání a vývoj těchto látek (King a Aaron 2015; Worek et al. 2016). Většina zemí tuto smlouvu podepsala, nicméně je zde několik zemí, které tak neučinily, mezi něž patří např. Palestina, Severní Korea, Egypt, Súdán (Hoog a Steinmetz 1993). I přes tuto mezinárodní dohodu se dále objevovaly případy zneužití NPL. Během války v Sýrii v roce 2013 bylo, pravděpodobně sarinem, usmrceno více než 1400 lidí (King a Aaron 2015). V roce 2017 byl látkou VX zabit bratr korejského vůdce Kim Jong-nam. V roce 2018 se odehrál teroristický útok v Salisbury ve Velké Británii, se kterým se dává do souvislosti látka ze skupiny novičok.

1.1.2 Mechanismus účinku OFI

OFI ovlivňují přenos nervového vzruchu interakcí s cholinergní neurotransmisí. Způsobují ireverzibilní inhibici enzymu AChE. Fyziologická funkce tohoto enzymu spočívá v degradaci neuromediátoru acetylcholinu (ACh) na nervových synapsích a nervosvalových ploténkách. Inhibice AChE se projevuje akutní cholinergní krizí v důsledku nahromaděného ACh, který trvale dráždí cholinergní receptory a narušuje tak nervový přenos (Maxwell et al., 2006). Inhibice se manifestuje nikotinovými, muskarinovými a centrálními příznaky dle lokalizace zasaženého enzymu, resp. dle stimulovaných receptorů. Délka trvání i hloubka cholinergní krize závisí na bráně vstupu do organismu, na délce expozice i na druhu OFI, kterým byl organismus zasažen (Sidell 1974; Abou-Donia 1981). Inhalační podání letální dávky může způsobit smrt během několika minut, zatímco absorpce stejné dávky přes kůži ji oddálí o jednu až dvě hodiny. Perkutánně má nejvyšší toxicitu látka VX, což je dáno jejím lipofilním charakterem. Sarin a soman mají v důsledku své méně lipofilní povahy několikanásobně nižší LD₅₀ při inhalačním podání v porovnání s perkutánním (Toxicology 1997). Mimo

příznaky způsobené zasažením cholinergního systému se objevují u otrav OFI také příznaky necholinergní. Po překonání akutní fáze otravy se mohou vyskytnout další změny v organismu, které se projevují s latencí pár hodin až měsíců (He et al. 1998). Podprahové dávky OFI mohou také způsobit chronické otravy, způsobené akumulací OFI v organismu (Loh et al. 2010). Charakter chronické otravy se podobá obrazu pozdních neuropsychiatrických potíží, vyskytujících se u akutních otrav (Etemad et al. 2014).

Aktivní místo AChE se skládá ze tří aminokyselinových zbytků (Ser-His-Glu) známých jako katalytická triáda enzymu. Za fyziologických podmínek, kdy AChE hydrolyzuje ACh, se nukleofilní serin AChE váže na ACh a štěpí ho na acyl-serin a cholin. Molekula vody aktivovaná histidinem dále hydrolyzuje acyl-serin na acetát a volný enzym (Quinn 1987). Mechanismus účinku OFI (Obrázek 2) začíná podobně jako vazba na ACh interakcí serinu AChE s OFI, na rozdíl od interakce s ACh je však tato vazba kovalentní. Spontánní hydrolýza vedoucí k obnově činnosti enzymu je extrémně pomalá (hodiny až dny), avšak může být výrazně urychlena reaktivátory AChE, jež jsou základem kauzální léčby (Masson a Lockridge 2010; Mercey et al. 2012). Pokud neprobíhá hydrolýza komplexu OFI-AChE, dochází u některých látek k dealkylaci alkoxylových skupin na atomu fosforu a tvorbě solných můstků mezi fosfonovým anionem a protonizovaným histidinem. Tímto procesem (tzv. aging) se vzniklý komplex stabilizuje a následně je již nemožné enzym reaktivovat. Časový odstup a rychlost, za který komplex dealkyluje se liší pro různé druhy OFI (od pár minut až po desítky hodin) (Worek et al. 2004).



Obrázek 2 – Mechanismus inhibice, dealkylace a reaktivace AChE

1.1.3 Klinická manifestace intoxikace OFI

Klinické příznaky akutní otravy se odvíjí od receptorů, které jsou nadměrně drážděny nadbytkem ACh. Podle druhu receptorů v periférii rozlišujeme muskarinové a nikotinové příznaky. Nadměrným drážděním muskarinových receptorů dochází ke zvýšené činnosti exokrinních žláz, což se projevuje sliněním, slzením, zvýšením žaludeční a bronchiální sekrece, rozvojem plicního edému a pocením (Lee a Tai 2001). Dále je typické zúžení zornic, poruchy akomodace, bradykardie, hypotenze, abdominální křeče, průjem a častější močení. Dráždění nikotinových receptorů na nervosvalové ploténce vede k samovolným svalovým záškubům, při těžších otravách k tonicko-klonickým křečím, které přechází až v paralýzu (Wadia et al. 1974). Ohrožení života nastává na základě paralýzy dýchacích svalů (mezižeberní svaly a bránice) v kombinaci se zvýšenou bronchiální sekrecí a útlumem dechového centra v mozku.

Nadměrná stimulace nikotinových a muskarinových receptorů v mozku zahrnuje cholinergní příznaky jako jsou křeče, deprese dýchacího centra, neklid, úzkost, zmatenost, poruchy koncentrace a paměti, poruchy spánku až kóma (Marrs 1993). Jednotlivé příznaky se odvíjí od místa, ve kterém dochází ke zvýšené stimulaci cholinergních neuronů. Cholinergní neurony se nacházejí v oblasti mozkové kůry, limbickém systému, předním mozku, mozkovém kmeni a hipokampu (Marrs 1993; He et al. 1998). K rozvoji akutní cholinergní krize přispívá i glutamatergní systém, který

je drážděn v důsledku nadměrného vyplavování glutamátu po intoxikaci OFI (Kaur et al. 2014). Nadměrné dráždění NMDA receptorů na glutamatergických neuronech vede k nahromadění vápníku uvnitř neuronů a následně k buněčné smrti. Dochází k celkové nerovnováze i mezi dalšími neurotransmitterovými systémy (GABAergní, dopaminergní). Vznikají tzv. excitačních léze a dochází k apoptóze hyperstimulovaných neuronů (Aigner 1995). Buněčná smrt, narušení cholinergních i necholinergních drah, degenerace axonů vede k progresivnímu poškození, které se projevuje edémem mozku, zvýšením propustnosti HEB, vznikem oxidačního stresu a zánětlivými změnami (Žďárová Karasová 2017). Klinické příznaky tohoto patologického stavu CNS se projevují v řádech několika hodin až měsíců (pozdní neurologické a neuropsychiatrické potíže) od intoxikace. Mimo neurologické příznaky popsané výše se mohou objevit i další necholinergní příznaky jako je metabolická acidóza, hyperglykémie a ovlivnění imunity (Bajgar 2004). Pozdní neuropsychiatrické problémy se mohou manifestovat jako poruchy paměti, agresivní chování, střídání nálad, halucinace a problémy s propojováním informací. Obraz chronické otravy OFI se manifestuje jako pozdní neurologický syndrom bez předchozí akutní cholinergní krize (Jokanovic 2012; Terry 2012).

1.1.4 Terapie otrav OFI

Standardní terapií využívanou pro otravy OFI je kombinace podání anticholinergně působící látky (atropin), oximového reaktivátoru a antikonvulziva (diazepam) souběžně s podporou dýchání a životních funkcí (Antonijvic et al. 2002). Anticholinergně působící atropin zmírňuje příznaky působením na postižených muskarinových receptorech na periférii. Zmírňuje dopad otravy na kardiopulmonální oběh. Neovlivňuje však nikotinové příznaky a do CNS proniká velmi pomalu (Kassa 2002). Podání antikonvulziv je zásadní pro potlačení záchvatovitých křečí, snížení poškození mozku, zabránění respiračnímu selhání a smrti. Lékem volby je diazepam (Marrs 1993). Pro odvrácení toxického účinku OFI jsou zásadní kauzální antidota, reaktivátory AChE. Tato léčiva urychlují proces reaktivace enzymu a navracejí ho znovu do funkčního stavu.

1.1.4.1 Reaktivátory acetylcholinesterázy

Kauzální léčba, která obnovuje funkci inhibovaného enzymu je zastoupena reaktivátory AChE. Typickou skupinou látek reaktivujících tento enzym jsou oximové reaktivátory. Oximový reaktivátor je schopen reagovat svou oximovou skupinou s atomem fosforu, který je vázán do aktivního místa AChE. Touto reakcí urychluje spontánní proces reaktivace, který jinak probíhá velmi pomalu (Eddleston et al. 2008). V klinické praxi jsou využívány látky pralidoxim a obidoxim. Další tři z pěti standardních reaktivátorů, trimedoxim, methoxim a asoxim (HI-6) jsou využívány specificky v různých zemích především pro první pomoc a odbornou lékařskou pomoc v bojových podmínkách. I přes dlouholetý výzkum s sebou reaktivace AChE nese řadu problémů. Nejzásadnější nedostatky dostupných standardních oximových reaktivátorů jsou uvedeny níže:

- Oximové reaktivátory působí selektivně s různou účinností pro odlišné druhy OFI. Vzniklé komplexy OFI-AChE se liší svou strukturou a účinnost jednotlivých reaktivátorů je odlišná pro různé OFI (Shih et al. 2012; Mercey et al. 2012; Korabecny et al. 2014).
- Dealkylovaná forma AChE je oximovými reaktivátory nereaktivovatelná.
- U některých oximů se vyskytuje problém s opětovnou inhibicí (reinhibicí) AChE fosforylovaným oximem (Maxwell et al. 2013).
- Oximové reaktivátory nesou minimálně jeden kladně nabitý atom dusíku ve své struktuře (zajišťuje vazbu do anionického místa AChE), který brání prostupu reaktivátoru do CNS. Reaktivace AChE tedy probíhá prakticky pouze na periférii a činnost AChE v CNS zůstává neobnovena, či je obnovena nedostatečně.

1.2 Hematoencefalická bariéra a vstup reaktivátorů do CNS

Funkce hematoencefalické bariéry (HEB) spočívá v ochraně mozku před potenciálně škodlivými látkami. Odděluje krevní oběh od mozkové tkáně a tvoří rozhraní, které selektivně propouští látky. Pouze na několika místech není HEB vytvořena, jedná se např. o *area postrema* a subfornikulární orgán, kde jsou kapiláry fenestrovány a vstup látek do mozku je méně selektivní. Povrch těchto kapilár je však vzhledem k celkové ploše HEB zanedbatelný a eventuální vstup skrz tato místa má

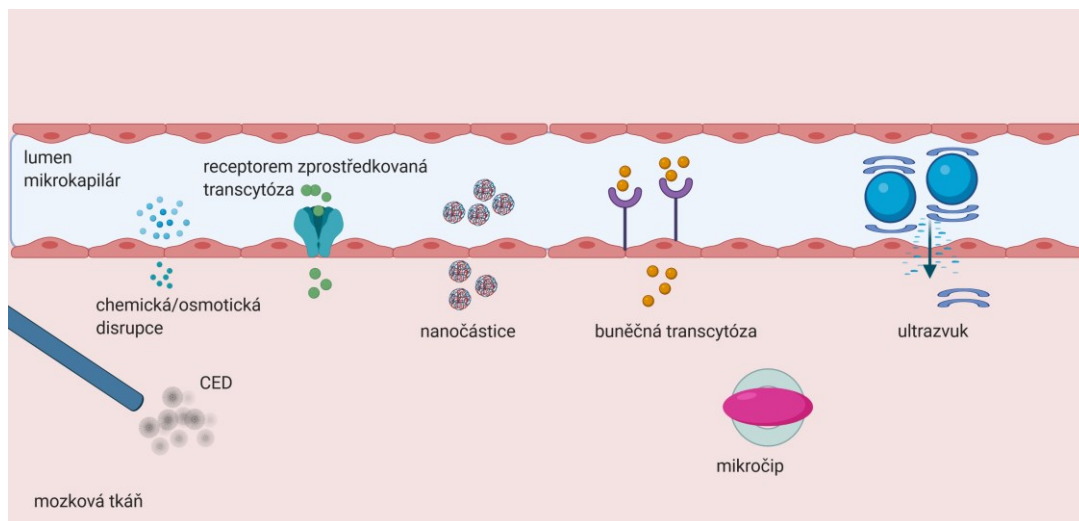
omezený význam. HEB zajišťuje jak ochranu, tak přenos látek do CNS. Skládá se z ploché vrstvy endoteliálních buněk (BMECs z angl. Brain Microvascular Endothelial Cells) které jsou hlavní jednotkou HEB. Přiléhají na bazální membránu ve stěnách mozkových kapilár. BMECs jsou v kontaktu s dalšími buňkami, které tvoří mikroprostředí HEB. Jsou to gliové buňky (astrocyty a mikroglie) a pericyty, které zajišťují výživu a imunitní ochranu. BMECs v cévách mozku jsou v těsném kontaktu, tvoří tzv. těsná spojení (TJs z ang. Tight Junctions) a neobsahují fenestrace, které jsou v jiných tkáních běžně přítomny. Tím zabraňují paracelulárnímu transportu látek. Látky tedy prostupují výhradně transcelulárně skrze dvě membrány a tento proces je vysoce selektivní. Pasivní difúzí přes fosfolipidové membrány BMECs pronikají pouze malé lipofilní sloučeniny a plynné molekuly. Přenos větších molekul může být zajištěn transportéry či transcytózou (Alavijeh et al. 2005).

Velikost molekuly, stupeň ionizace, lipofilita, prostorová konformace sloučenin a počet donorových a akceptorových vazeb jsou zásadními faktory pro překonání HEB pasivní difúzí (Abbott et al. 2006; Wilhelm et al. 2014). S rostoucím nábojem a velikostí molekuly se snižuje šance na proniknutí. V HEB se dále nachází široká škála transportérů, které mohou usnadnit či znesnadnit prostup jejich substrátů do mozku. Bylo zjištěno, že až 98 % malých a 100 % velkých molekul nedosáhne CNS, ať již z důvodu nepřekonání HEB či díky efluxním mechanismům (Pardridge 2005). Pro léčiva působící mimo CNS je to požadovaná vlastnost, pro léčiva interagující se strukturami v CNS je to naopak zásadní nedostatek.

Jak bylo již řečeno, OFI jako lipofilní látky rychle a snadno pronikají do CNS, zatímco reaktivátory AChE s nabitým dusíkem ve své molekule CNS nedosáhnou, nebo jen v omezeném množství. Lorke a spol. ve své studii uvádí, že CNS dosáhnou standardní oximové reaktivátory pouze ze 4–10 % své plazmatické koncentrace (Lorke et al. 2008). Jiné studie uvádí ještě menší procenta, Žďárová Karasová uvádí ve své studii pouze 0–3 % (Žďárová Karasová et al. 2014).

Protože ochrana mozku před účinky NPL je při léčbě otravy zásadní, hledání řešení, jak ji docílit je důležitým aspektem ve výzkumu terapie otrav OFI. Přestože způsoby, jak zlepšit prostup reaktivátorů přes HEB byly a jsou intenzivně studovány, doposud nebylo nalezeno univerzální řešení aplikovatelné v praxi. Níže jsou znázorněny obecné

strategie pro zvýšení dostupnosti látek v CNS (Obrázek 3), a popsány strategie pro zlepšení dostupnosti reaktivátorů AChE v mozku.



Obrázek 3 – Strategie pro překonání HEB. Mezi vybrané strategie pro překonání HEB patří zvýšení paracelulárního transportu, které zahrnuje osmotickou, chemickou, fyzikální či ultrazvukovou disrupci. Transcelulární prostup může být usnadněn receptorem či buňkami zprostředkovanou transcytózou či vazbou na nanočástice. Mezi strategie, které se snaží HEB obejít se řadí katetry zprostředkované podání (CED) a využití mikročipů. Adaptováno dle (Hersh et al. 2016).

1.2.1 Využití nanočástic

Nanočástice (NČ) jsou nosiče, jejichž velikost nepřesahuje 100 nm. Mohou být syntetického či přírodního původu a jejich využití v medicíně a biologii má velký potenciál. Jsou předmětem výzkumu v oblastech, jako je studium biologických struktur, mapování biologický procesů, ale také v transportu léčiv na místo požadovaného účinku. Částice po i.v. podání migrují krevním řečištěm k HEB, kterou překonávají různými způsoby. To záleží na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech a povaze ligandů, které na svůj povrch váží. V obecné rovině, NČ mohou zlepšovat vlastnosti navázaného léčiva, mohou ho chránit před biodegradací či řízeně uvolňovat v místě jeho účinku. Různé druhy NČ využívají různé způsoby, jak překonat HEB, od pasivní difúze po transport zprostředkovaný receptorem (Wang a Wang 2014; Kreuter et al. 1995; Saraiva et al. 2016).

NČ připravené z lidského sérového albuminu (HSA NČ) vykazují minimum nežádoucích účinků. V oblasti reaktivátorů AChE byly připraveny HSA NČ vázané

na oximový reaktivátor HI-6. Bylo pozorováno, že reaktivátor prostoupil skrz endoteliální buněčný model HEB (Dadparvar et al. 2011) a reaktivoval mozkovou AChE s dvojnásobným účinkem v porovnání s nevázanou HI-6 (Dadparvar et al. 2014). Jiná studie popisuje vyšší schopnost HI-6 i obidoximu navázaného na HSA NČ reaktivovat AChE inhibovanou OFI po překonání buněčné monovrstvy simulující HEB (pBCEC – primární endoteliální buňky izolované z prasečí mozkové kapiláry z ang. Primary Porcine Brain Capillary Endothelial Cells). Přesný mechanismus prostupu HSA NČ však nebyl doposud objasněn. Předpokládá se interakce s apolipoproteiny v krevním řečišti, pomocí nichž se transportním systémem pro lipoproteiny dostane celý komplex do CNS (Wagner et al. 2010).

Pevné lipidové NČ s enkapsulovaným 2-PAM byly využity k profylaktické ochraně a post-expoziční léčbě potkanů otrávených paraoxonem (POX). 2-PAM vázaný na NČ reaktivoval AChE v mozku z 15 % v porovnání s nulovou reaktivací nevázaného. Poločas eliminace enkapsulovaného 2-PAM byl 6krát delší v plazmě a 2krát delší v mozku než u volného 2-PAM. Nejvyšší koncentrace 2-PAM v mozku byla dosažena po 45 min od aplikace, kdy po intoxikaci $2 \times LD_{50}$ POX přežilo 50 % potkanů v porovnání s 10 % u volného 2-PAM. Účinnost této sloučeniny by tedy mohla být využita v profylaxi (Pashirova et al. 2017).

NČ z mezoporézního oxidu křemičitého obalené transferinem (TF NČ) využívají tranferinového transportéru v HEB pro svůj vstup do CNS. TF NČ byly konjugovány s HI-6 a po intoxikaci somanem obnovily činnost mozkové AChE z 20 % (Yang et al. 2016).

Přístup využívající NČ však s sebou nese také řadu omezení. Nežádoucí účinky NČ vyplývají z jejich nespecifických vazeb na struktury v organismu a akumulaci, což způsobuje alergické a toxické reakce. Navíc návrh a produkce NČ je velmi nákladným a komplikovaným procesem, pro který je často charakteristická rozdílná účinnost enkapsulace léčiva, což vede k nekonzistentnímu dávkování (Wilczewska et al. 2012).

1.2.2 Inhibice P-glykoproteinu

Tento přístup je založen na hypotéze, že oximové reaktivátory jsou substráty efluxního transportéru P-glykoproteinu (Pgp). Pgp je aktivní efluxní transportér lokalizovaný na luminální membráně BMECs v HEB, který patří do transportérové

rodiny ABC transportérů. Až 60 % léčiv uvedených na trh interaguje s transportéry této rodiny (Hersh et al. 2016). Pgp vrací své substráty zpět z BMECs do krve a tím jim brání překonat HEB. Jeho funkcí je ochránit mozek před potenciálně škodlivými cizorodými látkami. Nachází se v mnoha tkáních organismu (např. v tenkém střevě, játrech, ledvinách, HEB). Inhibicí Pgp dochází ke zvýšení prostupu jeho substrátů přes bariéru, kde je lokalizován. Jeho substrátová specifita je široká, mnoho chemicky i funkčně rozličných látek s ním interaguje (Demeule et al. 2002). Typické substráty mívají molekulovou hmotnost >400 Da, jsou hydrofobní či amfifilní povahy a často mívají za fyziologického pH kladný náboj. Některé substráty mají planární uspořádání molekuly a nesou NH₂ skupinu v postranním řetězci (Hooiveld et al. 2001).

Interakci 2-PAM s Pgp studoval Gallagher a spol. na buněčné linii MDCKII a BC1-hBMEC, které tento transportér exprimují. Po průchodu skrz monovrstvu buněk navazovala reaktivační esej s AChE inhibovanou POX. Avšak, přidaný inhibitor Pgp neměl žádný vliv na reaktivaci ani na vstup skrz monovrstvu (Gallagher et al. 2016).

Bylo pozorováno, že aplikace HI-6 se současným podáním tariquidaru (inhibitor Pgp) ukázala 2krát vyšší hladinu HI-6 v mozku potkanů (Joosen et al. 2011). Navíc, navazující studie prokázala vyšší terapeutickou účinnost kombinace HI-6 a atropinu s tariquidarem než bez něj, u potkanů otrávených somanem. V pilotním experimentu, však nebyla prokázána přímá souvislost inhibice Pgp a zvýšení účinnosti HI-6. Vliv na lepší terapeutickou účinnost této kombinace mohl mít i atropin, který v jiné studii na MDCK buněčné linii s Pgp interagoval, či samotný neuroprotektivní účinek tariquidaru (Joosen et al. 2011; 2016; Gallagher et al. 2016).

1.2.3 Zvýšení lipofility

Zvyšováním lipofility se zvyšuje prostupnost přes biologické membrány, tedy i přes HEB. Syntéza analogů 2-PAM s delším řetězcem navázaným na dusíku zvyšuje lipofilitu, což by mělo vést ke zlepšení prostupu do CNS. Lipofilnější analog 2-PAM sice zvýšil vstup do mozku potkanů na 30 %, nicméně reaktivační účinnost lipofilnějších analogů byla dvakrát nižší než u 2-PAM a toxicita výrazně vyšší (Okuno et al. 2008). Inkorporace atomu fluoru do heterocyklického kruhu pyridinových oximů zvýšila jejich lipofilitu. Zlepšení prostupu těchto analogů do CNS bylo predikováno *in*

vitro metodou PAMPA a výsledky odpovídaly standardním látkám běžně dostupným v CNS s tím, že vyšší dostupnost korelovala s narůstajícím počtem atomů fluoru v molekule (Jeong et al. 2009). Nicméně fluorovaný oxim K203 neprokázal lepší prostupnost do CNS *in vivo* a jeho reaktivační účinnost u AChE inhibované tabunem byla srovnatelná s nemodifikovanou K203 (Kassa et al. 2010).

Jako úspěšné lze považovat studie, kde lipofilní analogy fenoxalkyl pyridiniových oximů prokázaly ve srovnání s 2-PAM u potkanů lepší účinnost u záchvatů křečí navozených sarinem a látkou VX (Chambers et al. 2016; Zorbaz et al. 2018).

Na druhou stranu, obecně zvyšování lipofily zlepšuje vstup do CNS a zároveň zvyšuje riziko neurotoxicity, špatné rozpustnosti ve vodném prostředí a off-target reakcí (Arnott a Planey 2012; Voicu et al. 2016).

1.2.4 Konjugace s cukry

Tato hypotéza předpokládá, že oxim navázaný na cukernou složku by mohl být transportován přes HEB pomocí glukózového transportéru, který rozpozná navázanou cukernou část. Transportér GLUT1, zajišťující transport D-glukózy udržuje glykémii v mozku tím, že váže hexózy na obou stranách endotelových buněk (luminální i abluminální) (Cornford a Hyman 2005). 2-PAM a TMB-4 byly konjugovány s glukózou a galaktózou. V *in vivo* experimentech tyto sloučeniny snížily hypotermii vyvolanou POX u potkanů, čímž prokázaly svou přítomnost v CNS. Mechanismus účinku nebyl objasněn, pravděpodobně byl centrální efekt důsledkem vyšší biologické dostupnosti reaktivátorů. Přímá interakce sloučenin s GLUT1 však prokázána nebyla (Rachaman et al. 1979; Heldman et al. 1986). Toxicita těchto konjugovaných sloučenin je sice nižší než u standardních oximů, ale stejně tak je jejich reaktivační účinnost nižší než u 2-PAM, jak bylo zjištěno na lidské AChE inhibované POX, DFP a látkou VX (Garcia et al. 2010). U enzymu inhibovaného tabunem, sarinem a somanem tyto sloučeniny žádný reaktivační účinek neprokázaly. Dalším omezením konjugace reaktivátorů s cukry je reaktivita cukerné složky s různými strukturami v organismu, tyto cukry využívajícími (např. s erytrocyty a komponenty krevní plazmy).

1.2.5 Proléčiva

Koncept vytvoření proléčiva modifikací struktury oximového reaktivátoru je založen na zlepšení prostupnosti navázáním nenabitého řetězce. Po prostupu je

proléčivo oxidováno a je odštěpen účinný samotný reaktivátor, který by měl reaktivovat mozkovou AChE. Bylo popsáno, že účinnost proléčiva 2-PAM (pro-2-PAM) eliminovala záchvaty křečí u zvířat, navozené podáním DFP (Gordon et al. 2008). Po intoxikaci sarinem, somanem a látkou VX byla reaktivační účinnost srovnatelná až nižší v porovnání s nemodifikovanými reaktivátory (Shih et al. 2011). Potenciál praktického využití je navíc komplikován obtížnou syntézou a nízkou stabilitou látky z důvodu autooxidace (DeMar et al. 2010).

1.2.6 Nekvartérní reaktivátory

Standardní reaktivátory nesou ve své struktuře kvartérní dusík, což velmi omezuje jejich vstup do CNS. První práce zabývající se nekvartérními (nenabitými) reaktivátory popisuje testování oximů MINA a DAM, což jsou neutrální terciární reaktivátory, které přes HEB prostupují velmi dobře. Jejich reaktivační potenciál však nebyl dostatečný, ve vyšších dávkách navíc vykazují zvýšenou toxicitu (Askew 1956; Shih et al. 2012). Další nenabité reaktivátory již využívají tzv. duální vazebné strategie, která je založená na interakci ligandu s periferním anionickým místem AChE, zatímco (oximová) část zodpovědná za reaktivaci se váže do místa aktivního (Mercey et al. 2011; Gorecki et al. 2016).

Připojení fenyltetrahydroizochinolinu k piridyn-aldoximové struktuře vedlo k dostatečné reaktivaci AChE inhibované tabunem a VX *in vitro* (Mercey et al. 2011; Renou et al. 2013; 2014; Kliachyna et al. 2014). *In vivo* experiment na myším modelu však nepotvrdil nadějně výsledky a v porovnání s látkou HI-6 byla účinnost nesrovnatelná (Calas et al. 2017). Po připojení stejného substituentu na imidazolový aldoxim reaktivovala výsledná látka v porovnání se standardními reaktivátory lépe, potvrzení *in vivo* však chybí (Wei et al. 2014). Průlomovými molekulami tohoto typu se dá nazvat nová série dipolárních reaktivátorů založená na rovnováze mezi nabitým a nenabitým stavem molekuly, jež prokázala dobrou dostupnost v CNS i dostatečnou reaktivační účinnost *in vitro* (Radić et al. 2012; Kovarik et al. 2013), která byla srovnatelná s 2-PAM *in vivo* (Sit et al. 2011; Gorecki et al. 2017). Nejúspěšnější látka RS194b byla testována na opicích rodu makak po intoxikaci POX a sarinem, kdy po jejím podání byly eliminovány cholinergní příznaky otravy (Rosenberg et al. 2017; 2018). Tato látka je momentálně ve stádiu klinického hodnocení. Nenabité reaktivátory sice prokázaly vyšší potenciál vstupu do CNS, nicméně obecně je jejich reaktivační

účinnost ve srovnání se standardními látkami nižší. Navíc s připojením nenabitého řetězce se zvyšuje toxicita i riziko re-inhibice AChE v důsledku vyšší afinity sloučenin k enzymu. Látky jsou také hůře rozpustné ve vodných roztocích, což brání parenterální aplikaci, která je většinou vyžadována u látek typu antidot, kdy jejich podání a účinek musí být co nejrychlejší (Soukup et al. 2018).

1.2.7 Intranasální podání

Podání léčiva skrz nosní dutinu využívá speciálního prostředí, kde se na transportu podílejí nervová zakončení, lymfatický systém, mozkomíšni mok i cévní systém (Dhuria et al. 2010; Hanson a Frey 2008). Bylo pozorováno, že podání obidoximu intranasálně zabránilo smrti a redukovalo příznaky u potkanů otrávených somanem (Krishnan et al. 2016). Různé studie uvádějí pozitivní i negativní výsledky, kdy některé látky pronikají do CNS při intranasálním podání snadno (např. inzulin, kokain, morfin) a jiné vůbec (estrogen, vitamin B1, melatonin). Tento způsob podání se jeví jako velice nadějný, nese s sebou však stále velké překážky pro praktické využití. Je náročné kontrolovat hladinu podaného léčiva, neboť aplikace léčiva do nosní dutiny je místně velmi specifická a vyžaduje správnou formulaci účinné látky, která zabráni eliminaci z čichové sliznice mukociliárním systémem. Techniky podání jsou tedy poměrně složité a musí být uzpůsobeny i variabilitě ve stavbě nosní dutiny jedince (Gänger a Schindowski 2018).

Můžeme tedy shrnout, že hledání způsobů jak zvýšit terapeutickou hladinu reaktivátorů AChE v mozkové tkáni je i přes dlouhotrvající výzkum stále aktuálním a nedořešeným tématem. Žádný z výše popsanych přístupů nedosahuje z terapeutického pohledu uspokojivých výsledků. Léčba otrav NPL je komplikovanější i proto, že je zapotřebí doáhnou rychlého nástupu účinku a jednoduché manipulace s aplikačním prostředkem z důvodu potřeby podání antidot v bojových podmínkách v poli. Vývoj nových chemických entit jakožto potenciálních léčiv, které by měly potenciál prostoupit do CNS tedy vyžaduje metody, kterými je možné tuto vlastnost posoudit již v rané fázi výzkumu.

Pozn. Kapitola 1.1, 1.2 a 1.3 vychází z publikovaného přehledového článku (**Publikace 2**).

1.3 Metody pro posouzení CNS dostupnosti

Existuje několik způsobů, jak dostupnost látek v CNS testovat. Obecně se dají rozdělit na *in vivo*, *in silico* a *in vitro* metody. *In vivo* metody využívají testování s využitím zvířecích modelů. Výhodou *in vivo* metod je komplexnost testovaného systému, zachování vaskularizace a interakcí mezi jednotlivými součástmi HEB za fyziologického stavu. Mezi nejvyžívanější patří histochemické metody, farmakokinetické studie, kvantitativní autoradiografie, pozitivní emisní tomografie, magnetická rezonance a mikrodialýza (Mensch et al. 2009). *In vivo* metody poskytují spolehlivé a reprodukovatelné výsledky a jsou důležité i pro validaci *in vitro* metod.

V počátečních fázích výzkumu je tendence využívat metody, kde je uplatněn přístup 3R, který minimalizuje používání a utrpení laboratorních zvířat při zachování vysoké úrovně výzkumné práce (Kendall et al. 2018). Patří sem *in silico* metody využívající matematické a výpočetní modely pro predikci vlastností nově syntetizovaných látek (např. Lipinského pravidlo, HEB skóre, MPO model). Pro praktické potvrzení predikovaných vlastností slouží *in vitro* metody, které jsou vhodné zejména pro *screening* nově syntetizovaných látek ve větší kvantitě. *In vitro* metody probíhají zcela mimo živý organismus. V porovnání s *in vivo* metodami jsou jednodušší, levnější, rychlejší a eticky přijatelnější, na druhou stranu jsou vždy zatíženy jistou mírou nejistoty oproti *in vivo* metodám.

1.3.1 *In vitro* metody pro posouzení CNS dostupnosti

In vitro metody pro testování CNS dostupnosti můžeme rozdělit na buněčné a nebuněčné. Nebuněčné metody využívají k rozdělení látek, na potenciálně CNS dostupné a nedostupné, posouzení jejich fyzikálně-chemických vlastností. Patří sem např. IAM chromatografie, která hodnotí interakci látek s imobilizovanou umělou membránou tvořenou fosfatidylcholinem (Dash a Elmquist 2003). Zkouška paralelního umělého membránového pronikání (PAMPA z ang. Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) hodnotí pasivní transport látky skrz membránu tvořenou fosfolipidem izolovaným z mozku prasete (Di et al. 2003). Pro komplexnější testování zahrnující děje přítomné v živém organismu byly vyvinuty metody využívající buněčné kultury.

1.3.1.1 Metody využívající buněčné kultury

Buněčné modely HEB se dají rozdělit na statické a dynamické dle toho, zda na buňky v modelu působí smykové napětí (SS z ang. Shear Stress). Ve fyziologických podmínkách toto napětí vzniká tokem krve a působí na endotelové buňky v cerebrálních kapilárách (He et al. 2014). Ideální buněčný model pro studium penetrace přes HEB by měl splňovat co nejvíce z následujících charakteristik (Naik a Cucullo 2012):

- exprese těsných spojení, enzymů, transportérů a efluxních systémů
- zanedbatelný paracelulární transport
- selektivní a asymetrická permeabilita pro ionty
- přítomnost laminárního SS
- mezibuněčná komunikace a interakce
- reprodukovatelnost
- finanční efektivita

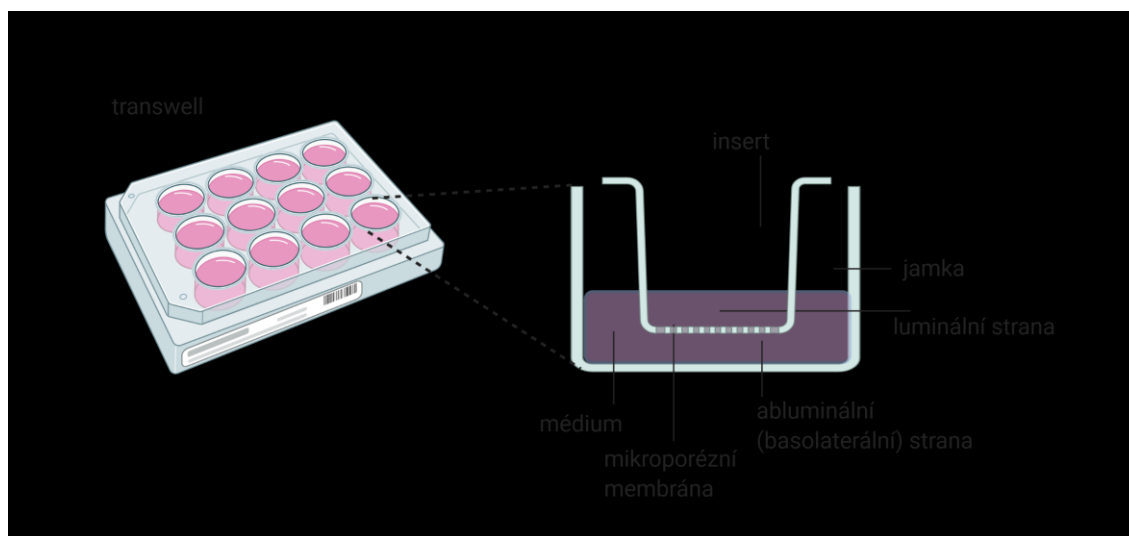
1.3.1.1.1 Statické modely

Statické modely jsou jednodušší a nezahrnují vliv SS. Dále se dělí dle toho, zda využívají monovrstvu či ko-kulturu více buněčných typů.

1.3.1.1.1.1 Modely využívající buněčnou monovrstvu

Monovrstevné modely využívají buněčnou linii nasazenou na vhodnou mikroporézní membránu. Tato membrána je umístěna ve víceúrovňové destičce (v insertové vložce) a vytváří tak vertikální oboustranný systém (transwell), ve kterém je možné sledovat prostup látek skrz monovrstvu v obou směrech (Obrázek 4). Membrána je semipermeabilní, její póry umožňují volnou difúzi živinám a růstovým faktorům, ale zároveň brání migraci buněk mezi kompartmenty při procesu buněčné proliferace a růstu (Naik a Cucullo 2012). Insertová vložka imituje luminální stranu (krev), a spodní jamka abluminální stranu (mozková tkáň). Buněčná monovrstva by tedy měla představovat BMECs mozkových kapilár, tedy hlavní buňky tvořící HEB. Monovrstva může být tvořena primární nebo imortalizovanou buněčnou linií. Primární

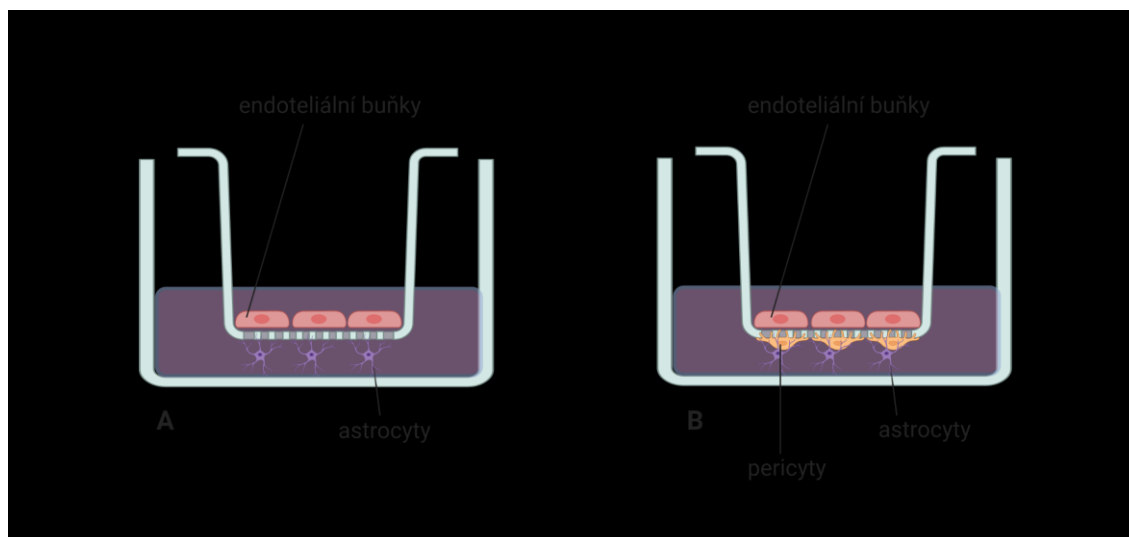
linie jsou nejčastěji izolované z mozkových kapilár hlodavců. Nevýhodou primárních linií je náročný proces izolace. BMECs tvoří jen malé procento mozkové tkáně, a proto je nutné k získání použitelného množství BMECs velké množství hlodavců. Využití větších zvířat (např. nelidští primáti) je řešením k získání většího počtu BMECs, nicméně experimenty s primárními buňkami jsou víceméně jednorázová záležitost (buňky nemají schopnost dál neomezeně proliferovat) a spotřeba zvířat je proto vysoká (Nakagawa et al. 2009). Izolované primární buňky je možné imortalizovat, čímž je eliminována spotřeba zvířat. Imortalizace buňky je proces vedoucí k nekonečné proliferaci. Provádí se chemickou či virovou transformací. Nevýhody těchto modelů spojené s kultivací bez přítomnosti dalších buněk tvořících HEB *in vivo* a nepřítomnost SS zůstávají i po imortalizaci. Navíc imortalizací dochází ke ztrátě vlastností primárních kultur jako je exprese enzymů, transportérů a snížená tvorba TJs (Daniels et al. 2013). Opakovaná pasáž může způsobit postupnou dediferenciaci a ztrátu charakteristik typických pro BMECs. Imortalizované linie jsou však vhodné pro studium transportérů a pro high-throughput screening (Bagchi et al. 2019). Vybrané imortalizované buněčné linie jsou popsány v kapitole 1.3.1.1.4.1.



Obrázek 4 – Transwell s detailem jamky z vertikálního pohledu

1.3.1.1.2 Modely využívající ko-kultury

Přítomnost více buněčných typů v jednom modelu zahrnují, tzv. ko-kulturní modely. Ko-kulturní model HEB je pro studium prostupnosti vhodný pro svou výbornou integritu. Přítomnost dalších buněk přispívá k tvorbě věrného fenotypu HEB především z pohledu bariérových vlastností. Buňky v ko-kultuře dosahují vysokých hodnot transendoteliálního odporu (TEER), který je specifický pro nepropustnou bariéru stejnou jakou je fyziologická HEB (Nakagawa et al. 2009). U dvou-buněčného modelu jsou BMECs nasazeny na insertovou membránu, zatímco na dno jamky či na spodní stranu insertu je nasazena další buněčná linie. Jednotlivé typy ko-kultivací jsou znázorněny na Obrázek 5. Interakce mezi BMECs a dalšími buněčnými liniemi (astrocyty, pericyty) utváří fenotyp BMECs podobnější tomu *in vivo*. Je zde indukována polarizovaná exprese transportérů, receptorů, enzymů a TJs, čímž se zlepšuje celková reprodukovatelnost modelu HEB (Nakagawa et al. 2007). Pro další vylepšení požadovaných vlastností byl testován model složený ze tří buněčných kultur – BMECs, astrocytů a pericytů. Ko-kultivace tří buněčných linií ukázala významné zlepšení bariérových vlastností v porovnání s monokulturami i s dvou-buněčnými ko-kulturami (Nakagawa et al. 2009). Ko-kultivace s neurony ukázala, že neurony také nepřímo modifikují permeabilitu a ovlivňují expresi transportérů a enzymů (He et al. 2014). Nedostatkem statických ko-kulturních modelů je opět nepřítomnost SS, náročnější a nákladnější kultivace, která činí tyto modely méně vhodnými pro *screeningové* testování (Siddharthan et al. 2007).



Obrázek 5 – Ko-kultivace dvou (A) a tří (B) buněčných typů v transwellovém uspořádání. Adaptováno dle (Kaisar et al. 2017).

1.3.1.1.2 Dynamické modely

Pro zvýšení reprodukovatelnosti modelu by mělo na buňky působit SS, které je ve fyziologických podmínkách generováno tokem krve. Ovlivňuje expresi a funkci transportérů, enzymů, iontových kanálů, tvorbu TJs a tím i bariérové funkce. Nejznámější jsou tři druhy dynamických modelů: Cone-Plate, dynamický a mikrofluidní.

Z historického hlediska byl Cone-Plate model prvním modelem, kdy byla buněčná monovrstva vystavena toku kapaliny. Využívá kuželu generujícího SS, které působí na destičku umístěnou pod ním prostřednictvím media. Nevýhodou tohoto modelu je nerovnoměrně rozmístěné SS působící na buněčnou monovrstvu a odlišné vlastnosti turbulentního SS tvořeného kuželem a laminárního SS tvořeného proudem tekutiny. Tento model navíc nezahrnuje další buněčné typy a tak výzkum vedl k vývoji dalších generací dynamických modelů (Naik a Cucullo 2012; Bussolari et al. 1982).

Dynamický model imitující cévy je sestaven z dutých vláken, na kterých jsou nasazeny buněčné kultury. Pumpa vstříkují do systému médium, čímž je dosaženo toku tekutiny celým systémem. Rychlostí toku lze kontrolovat velikost SS. Využití tohoto systému je omezené z důvodu špatné kontrolovatelnosti morfologie buněk na lumenální straně vlákna, spotřebě velkého počtu buněk (především při využití primárních kultur)

pro udržení monovrstvy a relativně dlouhého času do ustálení integrity monovrstvy (Naik a Cucullo 2012).

Mikrofluidní modely byly navrženy pro vylepšení vlastností dynamických modelů. Využívají dvou kolmých kanálů. Imobilizované buňky jsou umístěny v mikrofluidním kanálu a jsou stabilizovány podpůrnými 3D maticemi, druhý kanál vytváří SS. Membrány jsou dostatečně tenké, transparentní, pozorovatelné mikroskopem. Potřebné množství buněk je mnohonásobně nižší než u dynamických modelů a doba růstu pro ustálení integrity je kratší, což je výhodou oproti dynamickým modelům (Booth a Kim 2012).

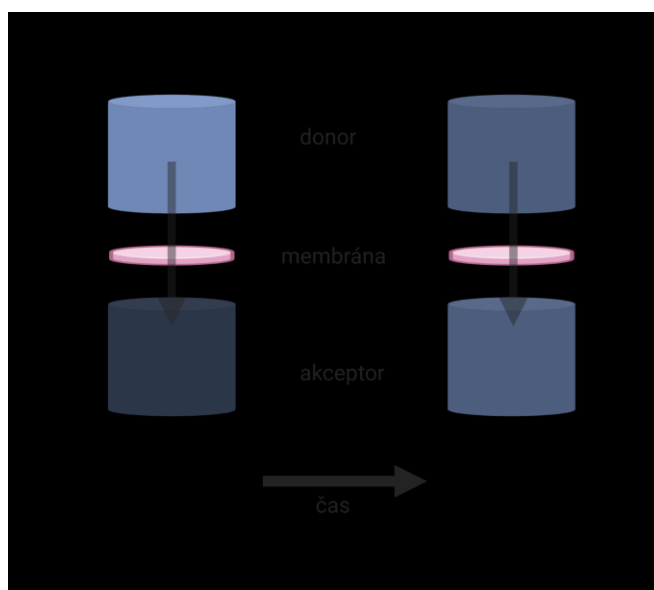
Ani žádný z dynamických modelů není ideální, navíc instrumentální náročnost dynamických modelů je vysoká a využití v praxi tudíž náročnější (He et al. 2014).

1.3.1.1.3 Modely založené na kmenových buňkách

Modely založené na kultivaci a diferenciaci pluripotentních kmenových (PSC), embryonálních (ESC) či indukovaných kmenových buňkách (iPSC) jsou velkým pokrokem směrem k dokonalému napodobení HEB *in vivo*. BMECs diferencované z iPSC prokázaly podobné vlastnosti jako primární BMECs (Kokubu et al. 2017). Model disponuje vysokými hodnotami TEER, expresí transportérů a enzymů specifických pro HEB (Li et al. 2019). Diferenciace BMECs a dalších buněk HEB z lidských somatických buněk vede k personifikaci a individualizaci výzkumu fyziologie i patologie HEB či interakcí nových látek s jejími strukturami. Je dokonce možné vytvořit specifické modely různých neurologických onemocnění a zkoumat jejich vliv na integritu HEB (Page et al. 2020). Proces diferenciaci kmenových buněk je složitý a zahrnuje řadu proměnných, nehledě na instrumentální i finanční náročnost celého procesu. Další překážkou jsou omezené zdroje iPSC linií a genetická variabilita jedince. Integrace iPSC derivovaných kultur do dynamického modelu, který zahrnuje SS je velké přiblížení situaci *in vivo* a nadějný směr pro vývoj věrohodného modelu lidské HEB (Vatine et al. 2019).

1.3.1.1.4 Vybrané *in vitro* metody pro posouzení CNS dostupnosti

Principem vybraných *in vitro* metod je sledování prostupu látky přes specifickou membránu (Obrázek 6).

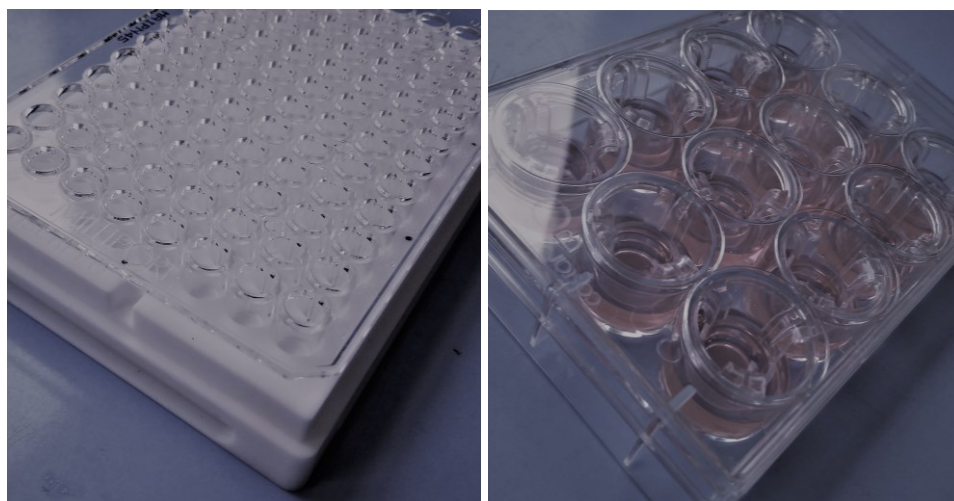


Obrázek 6 – Znázornění prostupu látek přes specifickou membránu v čase

PAMPA

Zkouška paralelního umělého membránového pronikání je *in vitro* metoda pro predikci prostupnosti léčiv přes biologické membrány. Původně byla zavedena pro predikci perorální absorpce (Kansy et al. 2004). Pro predikci průniku skrz HEB byla PAMPA modifikována použitím membrány tvořené lipidem z prasečího mozku (PBL, z ang. Polar Brain Lipid). Tato membrána tvoří rozhraní mezi akceptorovou a donorovou částí destičky (destička je znázorněna na Obrázek 7). Látky prostupují v čase skrz tuto membránu na základě pasivní difúze. Na tento typ transportu mají vliv fyzikálně-chemické vlastnosti testovaných látek. Látky tedy prostupují na základě své lipofility. Prostup látky je hodnocen po její detekci v akceptorovém kompartmentu a následném spočítání tzv. permeačního koeficientu (Pe). Porovnání Pe se standardními látkami umožňuje látku klasifikovat jako potenciálně schopnou/neschopnou překonat HEB. Výhodou této metodiky je reprodukovatelnost, rychlost, finanční dostupnost a možnost testování rozsáhlých setů látek. Je vhodná pro základní *screening*. Nezahrnuje však podíl jiných způsobů transportu, což ji znevýhodňuje v porovnání s metodami využívajícími buněčné linie, kde jsou zahrnuty děje přítomné v živé buňce

jako je aktivní a efluxní transport, metabolická aktivita (Naik a Cucullo 2012; Di et al. 2003).



Obrázek 7 – Destičky využívané pro metodu PAMPA (vlevo) a buněčné modely (vpravo)

1.3.1.1.4.1 Metody využívající imortalizované buněčné linie

Buněčná linie je nasazena na mikroporézní membránu, na které vytváří monovrstvu. Principem těchto modelů je sledovat vstup látek skrz tuto monovrstvu, která simuluje hematoencefalickou bariéru. Látky vstupují z donorového kompartmentu do akceptorového, kde je změřena jejich koncentrace v čase (zobrazení destičky pro buněčné modely je na Obrázek 7). Rychlost tohoto vstupu se udává jako Papp (aparentní permeační koeficient), na jehož základě lze předpovědět schopnost proniknout přes HEB. Propustnost vytvořené monovrstvy by měla odpovídat fyziologické HEB. Tedy látky, které *in vivo* CNS nedosáhnou (CNS-), by neměly prostoupit, a naopak látky v CNS *in vivo* dostupné (CNS+) by přes monovrstvu proniknout měly. Integrita buněčné monovrstvy, je dosažena na základě tvorby TJs a je zásadní pro zabránění paracelulárnímu vstupu molekul (Naik a Cucullo 2012). Může být charakterizována několika způsoby. Značením proteinů tvořících TJs (ZO-1, okcludin, kladin) specifickou protilátkou, permeabilitou molekul s různou molekulovou hmotností (MW) (inulin, manitol, dextran) nebo měřením TEER. Měření TEER je neinvazivní metoda, kterou lze použít i pro sledování průběhu tvorby monovrstvy a neinterferuje s testovanými látkami. Hodnoty TEER v mozkových mikrokapilárách *in vivo* dosahují $1000 \Omega \times \text{cm}^2$ (Butt et al. 1990; Srinivasan et al. 2015). Každá

z uvedených immortalizovaných buněčných linií dosahuje za statických kultivačních podmínek rozdílných hodnot TEER. Číselné hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 1. *In vivo* korelace prostupnosti látek využívajících k překonání HEB aktivní transport, či substráty efluxních transportérů závisí na jejich expresi příslušnou buněčnou linií. Exprimované transportéry specifikované u jednotlivých linií, které se běžně podílejí na transportu léčiv, jsou uvedeny také v Tabulka 1.

MDCK buněčná linie

Madin-Darby Canine Kidney buněčná linie je epitelálního původu pocházející z ledvinných tubulů psiho plemene kokršpaněl. Buňky ledvinných tubulů mezi sebou tvoří vysoce selektivní bariéru a mezi jednotlivými buňkami se tvoří pevná TJs. Tato buněčná linie je dobře použitelná pro testování potenciální prostupnosti látek přes HEB právě díky její vysoké integritě. Tato linie je jednoduchá na kultivaci, během 4–7 dní růstu dosáhne monovrstva plné konfluence a je použitelná pro experiment. Nevýhodou této linie je její epitelální původ, exprese endogenního (psiho) Pgp, který má odlišnou substrátovou specifitu od lidského a rozdíly v expresi dalších transportérů (He et al. 2014). Využití této linie pro testování interakcí s Pgp je možné po transfekci lidským MDR1 genem, kdy MDCK-MDR1 linie exprimuje lidský Pgp (Kuteykin-Teplyakov et al. 2010; Garberg et al. 2005).

Caco-2 buněčná linie

Caco-2 epitelální buněčná linie byla izolována z lidského střevního adenokarcinomu. Primárně je využívána jako model pro střevní absorpci, nicméně její korelace s jinými modely HEB je vysoká, a proto ji lze použít i pro predikci CNS dostupnosti. Její využití je vhodné především pro posouzení interakce látek s Pgp, neboť tato linie stabilně exprimuje lidský Pgp (Hellinger et al. 2012; Garberg et al. 2005). Výhodou této linie je vysoká integrita monovrstvy. Nevýhodou je její střevní původ a dlouhá doba kultivace (19–21 dní).

hCMEC/D3 buněčná linie

hCMEC/D3 (D3) patří mezi nejvyužívanější immortalizovanou endoteliální linii lidského původu. Jsou to immortalizované BMECs, které byly izolovány z lidských mozkových kapilár (Weksler et al. 2013; Male 2009). Exprese transportérů typických pro lidské BMECs je velkou výhodou této linie. Linie exprimuje lidský Pgp, avšak

za klasických kultivačních podmínek je tato exprese nižší než např. u CACO-2, či transfekovaných MDR-MDCK. Zvýšení exprese lze dosáhnout využitím vhodných induktorů (např. verapamil) (Male 2009). Nevýhodou této linie je nižší integrita monovrstvy, vyšší nároky na suplementaci kultivačního media a delší doba růstu k dosažení konfluence (9–12 dní) (Weksler et al. 2013).

Tabulka 1 – Tabulka shrnující vybrané vlastnosti buněčných kultur MDCK, CACO-2 a hCMEC/D3 (Helms et al. 2016; Quan et al. 2012; Veszelka et al. 2018; Srinivasan et al. 2015; Weksler et al. 2013; Duker et al. 2011)

	MDCK	CACO-2	D3
Zdroj buněk	psí ledviny	lidský střevní adenokarcinom	lidské mozkové kapiláry
Morfologie buněk	epitelové buňky distální tubulů	střevní epitel	endotelové buňky mozkových kapilár
Kultivační doba pro vytvoření monovrstvy	4–7 dní	14–28 dní	9–12 dní
Vybrané influxní transportéry	GLUT-3,-5 CAT-1, LAT-1, SAT-1	GLUT-1 PEPT1 CAT-1, LAT-1, SAT-1	GLUT-1 PHT-2 CAT-1, LAT-1, SAT-1 MCT-1 SLC1A2, SLC1C1
Efluxní transportéry	endogenní psí Pgp (Mdr1) Mrp1, Mrp2, Mrp5	Pgp (MDR1) MRP2,4,6 BCRP	Pgp (MDR1) MRP1,4 BCRP
TJs proteiny	ZO-1,2,3 klaudin 1	ZO-1,2,3 klaudin 1	ZO-1,2, klaudin 5
TEER hodnoty v $\text{ohm} \times \text{cm}^2$	1000	150–400	30–50

Vybrané buněčné linie se liší svým původem, epiteliální buňky jsou izolované z epitelu ledvinných tubulů a střevního adenokarcinomu. Epiteliální původ se vyznačuje mimo rozdílů v transportérové a enzymové výbavě také odlišnou stavbou TJs. Např. zásadní je odlišná exprese kladinu, jednoho z hlavních proteinů tvořících TJs. Pro epitelové buňky je typický kladin 1, zatímco pro endoteliální kladin 5 (Wilhelm et al. 2014). Epiteliální linie se vyznačují vysokými hodnotami TEER a restrikcí paracelulárního transportu. Endoteliální linie jsou izolované z endotelových buněk mozkových kapilár. Jejich transportérová a enzymová výbava je velice podobná *in vivo* endotelovým buňkám (Veszeka et al. 2018). Nevýhodou této endoteliální linie je nedokonalá tvorba TJs, která může zapříčinit zvýšený prostup látek z důvodu snížené paracelulární restrikce (Biemans et al. 2017).

2. Cíle práce

1. Zavedení, optimalizace, validace a vzájemné porovnání vybraných *in vitro* metodik vhodných pro *screening* prostupu potenciálních léčiv přes hematoencefalickou bariéru
2. Modifikace metodik pro studium transportérů přítomných v HEB
3. Testování standardních léčiv s klíčovou rolí v oblasti terapie otrav OFI a také nově syntetizovaných potenciálních léčiv vznikajících na pracovišti katedry Toxikologie a vojenské farmacie
4. Studium přístupů ke zvýšení dostupnosti léčiv v CNS včetně experimentálního ověření jejich účinnosti

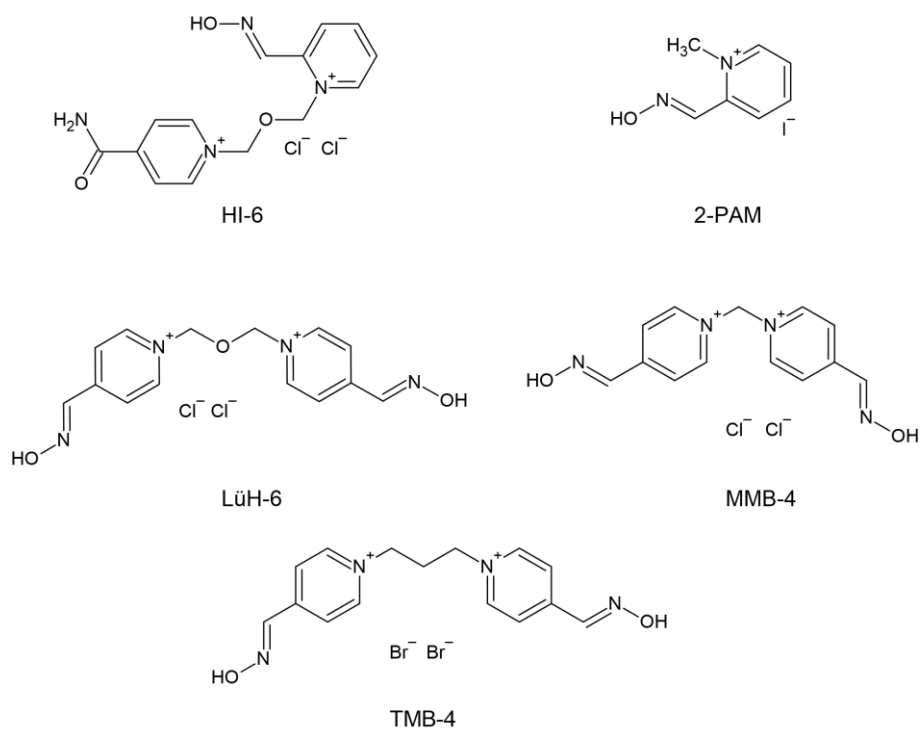
3. Materiál a metodika

3.1 Testované látky

Jako standardní látky pro validaci metod byla využita komerčně dostupná léčiva. Dále byly testovány standardně používané reaktivátory AChE a nově syntetizované reaktivátory AChE, diamantové nanočástice (ND) a cucurbit[7]urilové (CB[7] z ang. Cucurbit[7]urils) nanočástice.

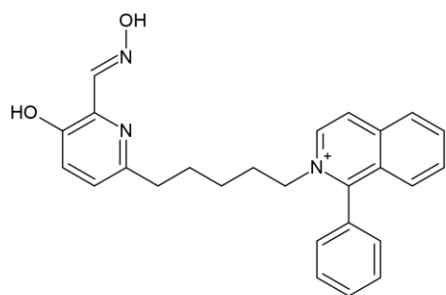
Standardní látky pro validaci metod byly pořízeny ze Sigma-Aldrich, Česká republika. Antipyrine (CAS No. 60-80-0), atenolol (CAS No. 29122-68-7), donepezil hydrochloride (CAS No. 120011-70-3), desipramine hydrochloride (CAS No. 58-28-6), chlorpromazin-d₆ hydrochloride (CAS No. 1228182-46-4), imipramin hydrochloride (CAS No. 113-52-0), caffeine (CAS No. 58-08-2), piroxicam (CAS No. 36322-90-4), propranolol hydrochloride (CAS No. 318-98-9), rivastigmine tartrate (CAS No. 129101-54-8), tacrine hydrochloride (CAS No. 206658-92-6), theobromine (CAS No. 83-67-0), theophylline (CAS No. 58-55-9), testosterone (CAS No. 58-22-0), cefuroxime (CAS No. 55268-75-2), furosemide (CAS No. 54-31-9), chlorothiazide (CAS No. 58-94-6), ranitidin hydrochloride (CAS No. 66357-59-3), sulfasalzine (CAS No. 599-79-1), lucifer yellow (CAS No. 67769-47-5).

Standardně používané reaktivátory HI-6 (CAS No. 34433-31-3), 2-PAM (CAS No. 6735-59-7), LüH-6 (CAS No. 114-90-9), MMB-4 (CAS No. 51026-61-0), TMB-4 (CAS No. 56-97-3) byly syntetizovány na KTVF, FVZ, UO v Brně. HI-6 použitá ve studii s CB[7] byla syntetizována na katedře chemie, PřF, UHK.



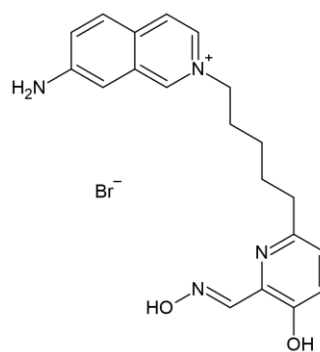
Obrázek 8 – Struktury standardních reaktivátorů HI-6, 2-PAM (pralidoxim), LüH-6 (obidoxim), MMB-4 (methoxim), TMB-4 (trimedoxim)

Monokvartérní reaktivátory K1371, K1373, K1374, K1375, K1385 byly syntetizovány na KTVF, FVZ, UO v Brně.



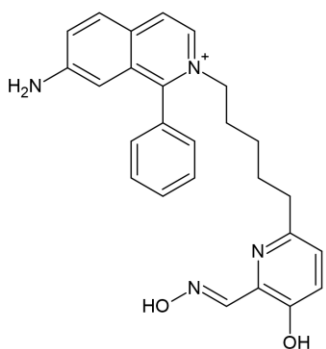
K1371

Br⁻



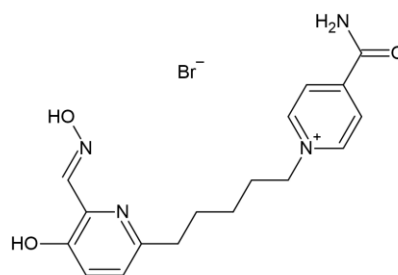
K1373

Br⁻



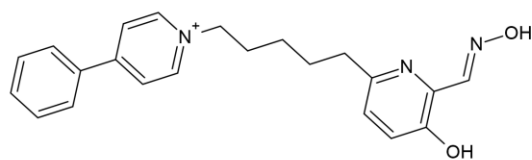
K1374

Br⁻



K1375

Br⁻

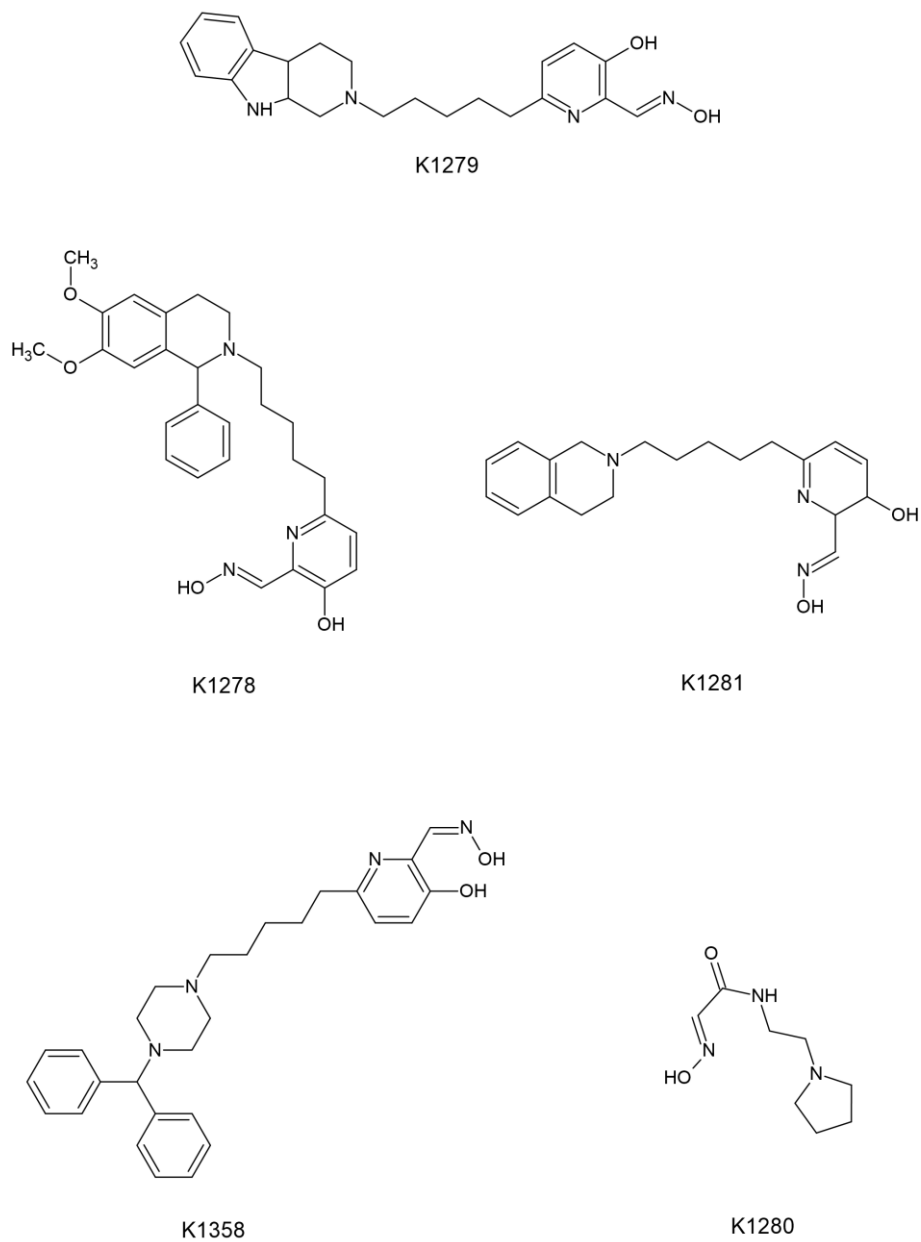


K1385

Br⁻

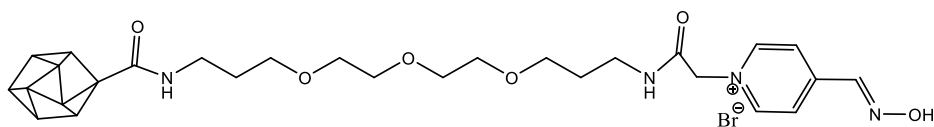
Obrázek 9 – Struktury monokvartérních reaktivátorů

Nekvartérní reaktivátory K1278, K1279, K1280, K1281, K1358 byly syntetizovány na KTVF, FVZ, UO v Brně.



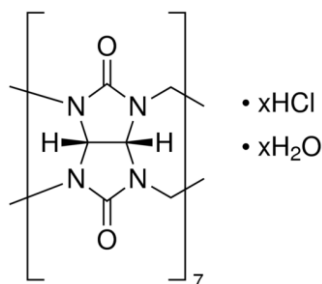
Obrázek 10 – Struktury nekvalterních reaktivátorů

ND s navázanou oximovou skupinou byly syntetizovány v rámci spolupráce s prof. Yevgenem Karpichevem (Department of Chemistry and Biotechnology, Tallinn University of Technology, Tallinn, Estonia).



Obrázek 11 – Diamantové nanočástice De-3 s navázaným reaktivátorem

CB[7] nanočástice (cucurbit[7]uril hydrate) byly pořízeny z Merck, Kenilworth, New Jersey, USA. Vazba na HI-6 proběhla dle (Andrýs et al. 2020).



Obrázek 12 – Cucurbit[7]urilové nanočástice

3.2 Použité metody

3.2.1 PAMPA model

3.2.1.1 Pracovní postup

Do 96 jamkové membránové destičky (Multiscreen-IP Filter Plates, Merck Millipore) byl napipetován roztok PBL (Polar Brain Lipid, Avanti) v objemu 4 μ l/jamka o koncentraci 20 mg \times ml⁻¹ rozpuštěný v dodekanu (Sigma-Aldrich). Akceptorová jamka byla naplněna 300 μ l PBS. Testované látky byly rozpuštěny dle rozpustnosti v DMSO (Dimethyl Sulfoxide for Molecular Biology, Sigma-Aldrich) a/nebo v PBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline pH = 7,4, Sigma-Aldrich) tak, aby bylo

dosaženo finální koncentrace. Finální koncentrace byla stanovena dle detekovatelnosti pomocí UV/VIS spektrofotometrie nebo HPLC-MS. Koncentrace DMSO ve finálním roztoku testované látky nikdy nepřesáhla 0,5 % (v/v). Následně byl do donorové části destičky pipetován roztok látek o finální koncentraci (všechny testované látky byly v rozmezí 20–300 μM) a celá destička byla přiložena na její spodní akceptorovou část tak, aby roztoky v obou částech byly v kontaktu s membránou. Testované látky difundovaly v čase přes membránu s PBL a jejich koncentrace v akceptorové i donorové části byla změřena po 3, 4, 5, 6 h inkubace v kvadruplikátech pomocí UV/VIS spektrofotometru (Multidetekční reader Synergy HT, BioTek) Koncentrace látek byla vypočítána podle kalibrační křivky a vyjádřena jako permeační koeficient (P_e). Rovnice pro výpočet P_e je uvedena v kapitole 3.2.6.1. Do vzorce je zadána I hodnota teoretické koncentrace (ekvilibrum), které by bylo dosaženo v obou kompartmentech, pokud by byla membrána dokonale propustná. Tato koncentrace je měřena z roztoku rozpuštěné látky naředěné pomocí PBS na polovinu (Di et al. 2003). Výsledný koeficient P_e pro každou látku byl vyjádřen jako průměr minimálně ze tří nezávislých měření \pm SEM.

3.2.2 MDCK buněčný model

3.2.2.1 Buněčná linie:

Pro tento model byla využita MDCK epiteliální psí buněčná linie ledvinného původu NBL-2 pořízená z ATCC (CCL-34). Buněčná linie byla kultivována v inkubačním boxu (Inkubátor Direct Heat CO₂, Thermo Scientific) při 37 °C, 5 % CO₂ v kultivačním médiu. Buňky byly pasážovány 1:6 pomocí 0,25% trypsin-EDTA roztoku (Sigma-Aldrich) 1–2 \times týdně. Médium bylo měněno každý 2.–3. den.

3.2.2.1.1 Růstové médium:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich)

10 % FBS (Fetal bovine serum, Sigma-Aldrich)

1 % PEN-STREP (Penicilin-streptomycin, Sigma-Aldrich)

3.2.2.1.2 Transportní médium:

Opti-MEM (Gibco)

3.2.2.2 Pracovní postup:

MDCK buněčná linie byla nasazena na destičku (Corning Transwel, Merck CLS3402) s 12 inserty, na mikroporézní polykarbonátovou membránu s póry o velikosti 3,0 μm . Buňky byly nasazeny v počtu 500 000/insert v 0,5 ml růstového média, do spodní části destičky bylo pipetováno čisté růstové médium v objemu 1,5 ml. 3. den bylo vyměněno médium v obou kompartmentech. 4. den po nasazení monovrstva dosahuje konfluence a je připravená na experiment. V den experimentu bylo odstraněno médium z obou kompartmentů a buněčná monovrstva byla opláchnuta přehřátým transportním médiem. Následně bylo do obou kompartmentů aplikováno 750 μl transportního média a destička byla inkubována 30 min. Testované látky byly rozpuštěny dle rozpustnosti v DMSO a/nebo v transportním médiu tak, aby bylo dosaženo finální koncentrace. Finální koncentrace byla stanovena dle detekovatelnosti pomocí UV/VIS spektrofotometrie nebo pomocí HPLC-MS (viz. níže). Koncentrace DMSO ve finálním roztoku testované látky nepřesáhla 0,5 % (v/v). Pro stanovení prostupu nanodiamantových částic (ND) byly vzorky dizagregovány pomocí ultrazvukového homogenizátoru (UP 50H jehlový homogenizátor, Hielscher, Teltow, Germany) 3 x 5 s za stálého chlazení ledovou lázní. Poté byly do donorových kompartmentů v triplicátu pipetovány roztoky (750 μl) testovaných látek rozpuštěných na požadovanou koncentraci (pro veškeré experimenty byly použity koncentrace 20–500 μM), pro ND byla použita koncentrace 10 a 100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$. Do akceptorového kompartmentu bylo pipetováno transportní médium ve stejném objemu. Následně byla destička inkubována při 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 . V časových intervalech 1, 2, 4 a 6 h byly odebrány vzorky z akceptorové části a pomocí UV/VIS spektrofotometru byla změřena koncentrace testovaných látek v triplicátech. Nárůst koncentrace testovaných látek byl vyjádřen jako tzv. aparentní permeační koeficient (Papp), který byl spočítán dle vzorce uvedeného v kapitole 3.2.6.2. Po odebrání posledního časového bodu byla provedena kontrola integrity monovrstvy pomocí fluorescenčně značeného dextranu (FITC-dextran, MW 10 000, Sigma-Aldrich) v koncentraci 0,4 $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$. Tento roztok FITC-dextran byl aplikován do donorové části po předchozím opláchnutí přehřátým PBS. Do akceptorové části byl aplikováno transportní čisté médium. Po 60 min inkubace byla změřena koncentrace FITC-dextranu v akceptorové části pomocí UV/VIS spektrofotometrie při vlnových délkách $\lambda_1 = 485 \text{ nm}$; $\lambda_2 = 528 \text{ nm}$.

Stanovení intracelulárního množství látky akumulovaného v buněčné monovrstvě bylo provedeno ve vybraných jamkách na konci experimentu. Buněčná monovrstva byla opláchnuta studeným PBS 2 × z obou stran. Následně byl aplikován lyzační pufr (1 % Triton X-100, 20 mM tris hydrochlorid, 150 mM chlorid sodný, Sigma-Aldrich), inserty byly mechanicky dizagregovány a opláchnuty transportním médiem. Poté byla v roztoku stanovena koncentrace látky UV/VIS spektrofotometrem.

HPLC-MS analýza

HPLC-MS analýza byla provedena na sestavě HPLC Dionex 3000 RS skládající se z vakuové pumpy HPG-3400RS s degaserem, autosampleru WTS-3000RS s 25 µl nástřikovou smyčkou, kolonového termostatu TCC-3000RS a diodového detektoru DAD-3000. Sestava byla řízena softwarem Chromeleon 6.80 ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu hybrid kvadrupól-orbitap Q Exactive Plus ovládaným programem Xcalibur 3.0.63. Spojení bylo provedeno pomocí vyhřívaného elektrospreje (HESI) s následujícím nastavením: zmlžující plyn 55 jednotek, pomocný plyn 15 jednotek, protisměrný plyn 3 jednotky, napětí na spreji 3,5 kV, teplota vstupní kapiláry 220 °C, teplota pomocného plynu 220 °C, nastavení S-lens RF 50. Složení mobilní fáze A (A): 0,1% (v/v) kyselina mravenčí v ultračisté vodě typ ASTM I (odpor 18,2 MΩ × cm⁻¹ při 25 °C) připravenou pomocí přístroje Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF. Složení mobilní fáze B (B): 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu (LC-MS kvalita).

Pro analýzu akceptorových a donorových roztoků byla použita gradientová metoda v reverzním módu, kde jako stacionární fáze byla použita kolona Kinetex C18 EVO (3,0 × 150 mm; 2,6 µm; 100 Å, Phenomenex, Japan). Gradient byl následující: 0-1 min 10 % B, pak nárůst na 100 % B během 3 min, pak 1 min 100 % B a následně byl 2,5 min ustalován na 10 % B. Průtok mobilní fáze byl 0,4 ml × min⁻¹, teplota kolony byla nastavena na 27 °C s nástřikem vzorku 5 µl. Analýza byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru v pozitivním módu v rozmezí m/z 150-1000. Kalibrace pro látky byla lineární, pětibodová a byla v rozmezí 5–100 µg × ml⁻¹ pro každou sledovanou sloučeninu.

HPLC-MS analýza byla využita pro stanovení látek, které nebylo možné kvantifikovat pomocí UV-VIS spektrofotometrie z důvodu nemožnosti rozpustit látku

v médiu v množství nad limitem detekce. Jednalo se o vzorky nekvarterních reaktivátorů (K1278, K1279, K1280, K1281).

3.2.3 D3 buněčný model

3.2.3.1 Buněčná linie:

Pro tento model byla využita D3/hCMEC endoteliální buněčná linie pocházející z mozkových kapilár člověka. Tato linie byla pořízena ze Sigma-Aldrich (SCC066). Buněčná linie byla kultivována v inkubačním boxu při 37 °C, 5 % CO₂ v kultivačním médiu. Povrch kultivační láhve byl potažen kolagenem (10 µg × cm²). Buňky byly pasážovány 1:3 až 1:6 pomocí 0,25% trypsin-EDTA roztoku 1–2 × týdně. Médium bylo měněno každý 2.–3. den.

3.2.3.1.1 Růstové médium:

EndoGRO (EndoGRO Complete Media Kit, Sigma-Aldrich)

1 % PEN-STREP

1 ng × ml⁻¹ FGF (Fibrinogen Growth Factor, Sigma-Aldrich)

3.2.3.1.2 Transportní médium:

Opti-MEM

3.2.3.2 Pracovní postup:

D3 buněčná linie byla nasazena na destičku (Corning Transwel, Merck CLS3460) s 12 inserty na mikroporézní PET membránu s póry o velikosti 0,4 µm. Buňky byly nasazeny v počtu 60 000/insert, který byl potažen kolagenem 10 µg × cm² (Collagen Type I, Rat Tail, Merck) a fibronectinem 5 µg × cm² (Fibronectin Human Plasma, Sigma-Aldrich) v 0,5 ml růstového média, do spodní části destičky bylo pipetováno čisté růstové médium v objemu 1,5 ml. 4. a 7. den bylo vyměněno médium v obou kompartmentech. 8. až 10. den po nasazení monovrstvy dosahuje konfluence a je připravená na experiment. Kontrola integrity monovrstvy je sledována měřením TEER. Měření TEER probíhalo při výměně média pomocí ERS-2 voltmetru (Millicel, Merck). Každá elektroda byla vložena do jednoho kompartmentu tak, aby se nedotýkala plastových částí destičky a po několika vteřinách od ustálení byla odečtena hodnota

TEER. Měření probíhalo v každé jamce v triplicátu (Hayes et al. 2016). V den experimentu bylo odstraněno médium z obou kompartmentů a buněčná monovrstva byla opláchnuta přehřátým PBS. Následně bylo do obou kompartmentů aplikováno 750 μ l transportního média a destička byla inkubována 30 min. Poté byly do donorových kompartmentů v triplicátu pipetovány roztoky (750 μ l) testovaných látek. Testované látky byly rozpuštěny dle rozpustnosti v DMSO a/nebo v transportním médiu tak, aby bylo dosaženo finální koncentrace. Finální koncentrace byla stanovena dle detekovatelnosti pomocí UV/VIS spektrofotometrie. Koncentrace DMSO ve finálním roztoku testované látky nepřesáhla 0,5 % (v/v). Do akceptorového kompartmentu bylo pipetováno transportní médium. Následně byla destička inkubována při 37 °C, 5 % CO₂. V časových intervalech 5, 15, 30 a 60 min byly odebrány vzorky z akceptorové části a pomocí UV/VIS spektrofotometru byla změřena koncentrace testovaných látek v triplicátech. Nárůst koncentrace testovaných látek byl vyjádřen jako Papp koeficient, který byl spočítán dle vzorce uvedeného v kapitole 3.2.6.2. Po odebrání posledního časového bodu byla provedena kontrola integrity monovrstvy pomocí FITC-dextranu v koncentraci 0,4 mg \times ml⁻¹. Tento roztok FITC-dextranu byl aplikován do donorové části po předchozím opláchnutí přehřátým PBS. Do akceptorové části bylo aplikováno transportní čisté médium. Po 60 min inkubace byla změřena koncentrace FITC-dextranu v akceptorové části pomocí UV/VIS spektrofotometrie při vlnových délkách $\lambda_1=485$ nm; $\lambda_2=528$ nm.

3.2.4 CACO-2 buněčný model

3.2.4.1 Buněčná linie:

Pro tento model byla využita lidská epiteliální adenokarcinomová CACO-2 buněčná linie pořízená z ATCC (HTB-37). Tato linie exprimuje efluxní transportér Pgp na své apikální straně. Buněčná linie byla kultivována při 37 °C, 5 % CO₂ v kultivačním médiu. Buňky byly pasážovány 1:3 až 1:6 pomocí 0,25% trypsin-EDTA roztoku 1–2 \times týdně. Médium bylo měněno každý 2.–3. den.

3.2.4.1.1 Růstové médium:

EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC)

20 % FBS

1 % PEN-STREP

3.2.4.1.2 Transportní médium:

Opti-MEM

3.2.4.2 Pracovní postup:

CACO-2 buněčná linie byla nasazena na destičku (Corning Transwel, Merck CLS3402) s 12 inserty na mikroporézní polykarbonátovou membránu s póry o velikosti 3,0 μm . Buňky byly nasazeny v počtu 240 000/insert v 0,5 ml růstového média, do spodní části destičky bylo pipetováno čisté růstové médium v objemu 1,5 ml. Přibližně 3 hodiny po nasazení bylo médium vyměněno a následně každý 3. den. Monovrstva dosahuje konfluence a požadované exprese kolem 21. dne od nasazení (Natoli et al. 2012). Vývoj tvorby monovrstvy je sledován měřením TEER. Měření TEER probíhalo při výměně média pomocí ERS-2 voltmetru. Každá elektroda byla vložena do jednoho kompartmentu tak, aby se nedotýkala plastových částí destičky a po několika vteřinách od ustálení byla odečtena hodnota TEER. Měření probíhalo v každé jamce v triplikátu (Tavelin et al. 2002). V den experimentu bylo odstraněno médium z obou kompartmentů a buněčná monovrstva byla opláchnuta přehřátým PBS. Následně bylo do obou kompartmentů aplikováno 750 μl transportního média a destička byla inkubována 30 min. V případě použití inhibitoru Pgp byl inhibitor již obsažen v transportním médiu. Pro všechny experimenty byl využíván inhibitor verapamil v koncentraci 15 μM . Následně byly do donorových kompartmentů v triplikátu pipetovány roztoky (750 μl) testovaných látek rozpuštěných na požadovanou koncentraci v transportním mediu s/bez inhibitoru Pgp. Testované látky byly rozpuštěny dle rozpustnosti v DMSO a/nebo v transportním médiu tak, aby bylo dosaženo finální koncentrace (pro standardní reaktivátory 100 μM). Finální koncentrace byla stanovena dle detekovatelnosti pomocí UV/VIS spektrofotometrie. Pro validaci metody byl využit Rhodamin 123 (R123) v koncentraci 5 μM . Testované standardní reaktivátory byly testovány v koncentraci 100 μM . Koncentrace DMSO ve finálním roztoku testované látky nepřesáhla 0,5 % (v/v). Do akceptorového kompartmentu bylo pipetováno transportní médium (s/bez inhibitoru Pgp). Pro testování interakce s Pgp byl sledován transport ve směru z apikální strany membrány (insertová strana) do basolaterální (jamka) a naopak s/bez přidání inhibitoru Pgp. Následně byla

destička inkubována při 37 °C, 5 % CO₂. V časových intervalech 30, 60, 120 a 240 min byly odebrány vzorky z akceptorové části a pomocí UV/VIS spektrofotometru byla změřena koncentrace testovaných látek v triplicátech. Nárůst koncentrace testovaných látek byl vyjádřen jako Papp. Porovnáním Papp obou směrů byla získána hodnota tzv. transportního poměru, který ukazuje na interakci s transportérem. Výpočty jsou uvedeny v kapitole 3.2.6.4. Po odebrání posledního časového bodu byla provedena kontrola integrity monovrstvy pomocí FITC-dextranu v koncentraci 0,4 mg × ml⁻¹ po 60 min inkubace.

3.2.5 *In vivo* farmakokinetické studie

3.2.5.1 Stanovení nově syntetizovaných reaktivátorů *in vivo*

In vivo studie probíhaly na myších Balb/c (Anlab Inc, Praha, Česká republika), které byly chovány v klimatizované místnosti s přísunem světla od 7 do 19 hod a přístupem ke stravě a vodě *ad libitum*. Nakládání se zvířaty probíhalo pod odborným dohledem Etické komise FVZ, UO v Brně (MO 30835/2018-689800).

Pro farmakokinetickou studii monokvartérních reaktivátorů byla myším podána dávka 5 % LD₅₀ (K1371 4 mg × kg⁻¹; K1374 5,25 mg × kg⁻¹; K1375 34 mg × kg⁻¹, obidoxim 8,05 mg × kg⁻¹) i.m., v objemu 1 ml × kg⁻¹. Látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku (0,9% v/v NaCl) s 20 % koliforu (Kolliphor EL, Sigma-Aldrich), v případě látky K1374 obsahoval aplikační roztok také 3 % DMSO z důvodu nízké rozpustnosti.

V čase 0, 3, 5, 15, 30, 45, 60, 120, a 240 min po aplikaci byl odebrán mozek zvířete (n=4), po předchozí transkardiální perfuzi fyziologickým roztokem, a zamražen na – 80 °C.

Před analýzou byly mozky zváženy (analytické váhy CPA225, Sartorius Stedim Biotech) a rozpuštěny ve čtyřnásobku své hmotnosti roztoku PBS (PBS tablety, Sigma-Aldrich). Dále byly homogenizovány mechanickým homogenizátorem (T-25 Ultra Turrax disperser, IKA, Staufen, Germany) a ultrazvukovým homogenizátorem (UP 50H jehlový homogenizátor, Hielscher, Teltow, Germany).

Ke 190 µl homogenátu mozkové tkáně bylo přidáno 10 µl vnitřního standardu (donepezil v methanolu o koncentraci 1 µM) a celá směs byla smísena s 1000 µl

acetonu. Vzorčky byly třepány 10 min na vortexu (Vortex Mixer Wizard, Velp Scientifica) při 1200 ot. a centrifugovány (Centrifuga Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen, Germany) 5 min při 4000 ot. Supernatant byl odpařen (CentriVap, Labconco Corporation, Kansas City, USA) a peleta následně rekonstituována ve 100 μ l 50 % roztoku acetonu (v/v). Kalibrace proběhla nástřikem 180 μ l blankového homogenátu mozku s 10 μ l testované látky v methanolu v koncentrační škále od 0,05 do 50 μ M.

HPLC-MS analýza

HPLC-MS analýza byla provedena na sestavě HPLC Dionex 3000 RS skládající se z vakuové pumpy HPG-3400RS s degaserem, autosampleru WTS-3000RS s 25 μ l nástřikovou smyčkou, kolonového termostatu TCC-3000RS a diodového detektoru DAD-3000. Sestava byla řízena softwarem Chromeleon 6.80 ve spojení s hmotnostním spektrometrem typu hybrid kvadrupól-orbitap Q Exactive Plus ovládaným programem Xcalibur 3.0.63. Spojení bylo provedeno pomocí vyhřívaného elektrospreje (HESI) s následujícím nastavením: zmlžující plyn 55 jednotek, pomocný plyn 15 jednotek, protisměrný plyn 3 jednotky, napětí na spreji 3,5 kV, teplota vstupní kapiláry 220 °C, teplota pomocného plynu 220 °C, nastavení S-lens RF 50. Složení mobilní fáze A (A): 0,1% (v/v) kyselina mravenčí v ultračisté vodě typ ASTM I (odpor 18.2 M Ω \times cm⁻¹ při 25 °C) připravenou pomocí přístroje Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF. Složení mobilní fáze B (B): 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu (LC-MS kvalita).

Pro analýzu vzorků kinetické studie monokvartérních reaktivátorů K1371 a K1375 byla použita gradientová metoda na reverzní fázi kolony Kinetex C18 EVO (3,0 \times 150 mm; 2,6 μ m; 100 Å, Phenomenex, Japan), s mobilní fází A a B. Gradient byl následující: 2 % B 1 min, nárůst na 35 % B během 2 min, nárůst na 50 % B během 3,5 min, nárůst na 100 % B během 0,5 min a 1 min 100 % B, následně byl systém nastaven zpět na 2 % B a 2 min ustalován. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min, teplota kolony byla nastavena na 35 °C s nástřikem 5 μ l. Analýza byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru se sběrem spekter v rozmezí 105-1000 m/z. Donepezil (finální koncentrace 1 μ M) byl použit jako vnitřní standard. Kalibrace pro všechny látky byla lineární, sedmibodová v rozmezí 50 nM–50 μ M. Pro kinetickou studii látky K1374 a obidoximu byla použita metoda s kolonou Hypersil Gold C8 (2,1 \times 100 mm, 1,9 μ m, Thermoscientific, Vilnius, Litva). Gradient 2 % B 0,3 min, nárůst na 100 % B během 3 min, 0,5 min 100 % B, následně byl systém nastaven na 2 % B a 2,2 min ustalován.

Průtok mobilní fáze byl $0,5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$, teplota kolony nastavena na $35 \text{ }^\circ\text{C}$ s nástřikem $2 \text{ } \mu\text{l}$. Analýza byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru se sběrem fragmentačních spekter v režimu paralelních reakcí. Donepezil (finální koncentrace $1 \text{ } \mu\text{M}$) byl použit jako vnitřní standard. Kalibrace pro látky byla lineární, sedmibodová v rozmezí 50 nM – $50 \text{ } \mu\text{M}$.

Časové změny analytu ve vzorcích byly přepočítány na reálnou koncentraci ($\text{ng} \times \text{ml}^{-1}$ mozkové tkáně) s využitím kalibrační křivky pomocí softwaru GraphPad Prism (verze 6.05, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3.2.5.2 *In vivo* stanovení penetrace HI-6@CB[7] do mozku

In vivo studie probíhaly na myších Babl/c (Velaz, Praha, Česká republika), které byly chovány v klimatizované místnosti s přísunem světla od 7 do 19 hod a přístupem ke stravě a vodě *ad libitum*. Nakládání se zvířaty probíhalo pod odborným dohledem Etické komise FVZ, UO v Brně (MO 30835/2018-689800).

Pro experimenty s CB[7] byly připraveny roztoky HI-6 a HI-6@CB[7] rozpuštěním dávky $48 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ HI-6 (dávka vázané i nevázané HI-6 byla ekvimolární a odpovídala 30 % maximální tolerované dávky (Hepnarova et al. 2019) a $187 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ CB[7] ve fyziologickém roztoku (0,9% v/v NaCl) a aplikovány i.m. v objemu $1 \text{ ml} \times \text{kg}^{-1}$.

V čase 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90, 120, 240 a 360 min po podání HI-6 a HI-6@CB[7] byly odebírány tkáňové vzorky. Zvíře se nacházelo v hluboké anestezii a odběr probíhal po transkardiální perfuzi (Infusion Syringe Pump Perfusor compact; B Braun Melsungen AG, Berlin, Germany) fyziologickým roztokem po dobu 5 min ($1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$). Vzorky mozku byly opatrně vyjmuty po otevření lebky a uschovány při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ až do HLC analýzy.

Methanol, chloroform, acetonitril, kyselina mravenčí, octan amonný a mravenčan amonný byly pořízeny od Honeywell (Charlotte, North Carolina, USA). Vzorky mozkové tkáně byly zváženy a přeneseny do vialek s lyzačními kuličkami (Lysing Beads D, průměr $1,4 \text{ mm}$, celková hmotnost $8,2 \text{ g}$ a Lysing Beads E, průměr 4 mm , množství 3 ks). Byl přidán octan amonný (pH 5) v koncentraci 25 mM v poměru 1:4 (m/m). Vzorek byl homogenizován ve dvou cyklech na FastPrep-24TM-5G instrument (MP Biomedical, Santa Ana, California, USA) po dobu 40 s se zrychlením $6 \text{ m} \times \text{s}^{-1}$.

K homogenátu mozkové tkáně (10–100 μ l) bylo přidáno 400 μ l methanolu a 800 μ l chloroformu. Vzorky byly třepány 10 min na vortexu (Vortex Mixer Wizard, Velp Scientifica) centrifugovány (Centrifuga Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen, Germany) 5 min 15000 \times g. Supernatant byl odpařen a peleta následně rekonstituována ve 100 μ l 25 mM roztoku octanu amonného (pH 5), vzorek byl třepán na vortexu a homogenizován v ultrazvukové lázni po dobu 10 min.

HILIC-UHPLC-MS/MS analýza

Analýza HI-6 a HI-6@CB[7] byla provedena na sestavě UHPLC Infinity II 1290 systém (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s využitím kolony Kinetex HILIC (2,1 mm \times 50 mm, 2,6 μ m, Phenomenex, Torrance, California, USA). Detekce proběhla pomocí hmotnostního spektrometru typu 6470 Series Triple Quadrupole (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Spojení bylo provedeno prostřednictvím vyhřívaného elektrospreje (HESI). Pro chromatografickou separaci byla použita metoda gradientové eluce s mobilní fází A (25 mM mravenčan amonný) a mobilní fází B (acetonitril s 0,3% kyselinou mravenčí). Gradient byl následovný: 0–0,5 min (10–10% A), 0,5–4,0 min (10–80% A), 4,05,0 min (80–80% A), 5,0–5,10 (80–10% A), 5,10–7,0 (10–10% A). Průtok mobilní fáze byl 0,40 ml \times min⁻¹. Parametry iontového zdroje byly následující: teplota plynu 100 $^{\circ}$ C, průtok plynu 10 l \times min⁻¹, zmlžující plyn 20 jednotek, teplota pomocného plynu 400 $^{\circ}$ C, průtok pomocného plynu 8 l \times min⁻¹, napětí v kapiláře 4500 V, napětí ve spreji 300 V. Nástřik vzorku byl 5 μ l.

Časové změny analytu ve vzorcích byly přepočítány na reálnou koncentraci (ng \times ml⁻¹ mozkové tkáně) s využitím kalibrační křivky pomocí softwaru GraphPad Prism (verze 6.05, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

3.2.6 Analýza dat

3.2.6.1 Výpočet Pe pro model PAMPA

Permeační koeficient $Pe \times 10^{-6}$ cm \times s⁻¹ pro model PAMPA byl vypočítán na základě této rovnice:

$$P_e = C \times \ln \left(1 - \frac{[drug]_{acceptor}}{[drug]_{equilibrium}} \right) \text{ where } C = \frac{(V_D \times V_A)}{(V_D \times V_A) Area \times Time}$$

kde

Area – plocha membrány v cm^2

Time – čas v s

V_D/V_A – objem donorového/akceptorového kompartmentu v l

C_0 – počáteční koncentrace testované látky v μM

[drug] acceptor – koncentrace látky v akceptorovém kompartmentu v μM

[drug] equilibrium – koncentrace látky v roztoku ekvilibria v μM

3.2.6.2 Výpočet Papp pro buněčné modely

Aparentní permeační koeficient $P_{app} \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ pro buněčné modely byl vypočítán na základě této rovnice:

$$P_{app} = \left(\frac{dC}{dt} \right) \times \frac{V_r}{(A \times C_0)}$$

kde

A – plocha buněčné monovrstvy v cm^2

dC/dt – rychlost nárůstu koncentrace látky v akceptoru v čase

V_r – objem akceptorového kompartmentu v l

C_0 – počáteční koncentrace testované látky v μM

3.2.6.3 Měření TEER

Finální hodnoty TEER v $\Omega \times \text{cm}^2$ byly vypočítány na základě této rovnice (Tavelin et al. 2002):

$$\text{TEER} = (R_{\text{MONOLAYER}} - R_{\text{EMPTY FILTER}}) \times A$$

kde

$R_{\text{MONOLAYER}}$ – hodnota naměřené rezistence v jamce s buněčnou kulturou v Ω

$R_{\text{EMPTY FILTER}}$ – hodnota rezistence v jamce bez buněčné kultury v Ω

A – plocha insertu v cm²

3.2.6.4 Výpočet transportního poměru pro posouzení interakce s P-glykoproteinem na CACO-2 buněčném modelu

Transportní poměr (TR) pro posouzení interakce s Pgp transportérem byl vypočítán na základě této rovnice (Polli et al. 2001):

$$TR = Papp (BA)/Papp (AB)$$

kde

Papp (BA) – Papp pro směr z basolaterální strany membrány na apikální

Papp (AB) – Papp pro směr z apikální strany membrány na basolaterální

3.2.7 Statistická analýza

Statistická analýza získaných dat byla uskutečněna pomocí statistického programu GraphPad Prism (verze 6.05, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Výsledné hodnoty koeficientů Papp a Pe jsou průměrem z n nezávislých měření ± SEM.

Pro zhodnocení korelací *in vitro* metod byl použit Spearmanův korelační test, n=20, (p ≤ 0.05).

Pro statistickou analýzu u CACO-2 buněčného modelu byla použita One-way ANOVA následovaná Sidak multiple comparison testem pro stanovení signifikantního rozdílu mezi TR s/bez inhibitoru (p ≤ 0.05).

Farmakokinetický profil byl vypočítán jako průměr z n měření ± SEM (n=6). Plocha pod křivkou (AUC z ang. Area Under the Curve) byla stanovena pomocí tohoto softwaru.

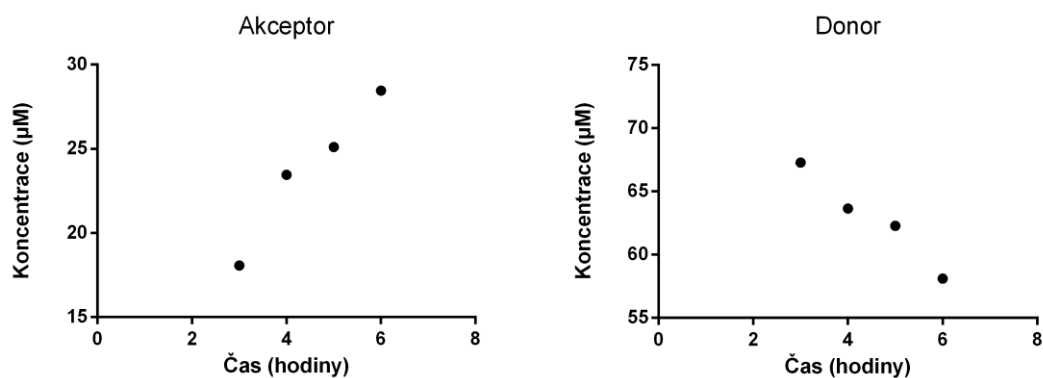
4. Výsledky

4.1 Modely pro predikci penetrace látek přes hematoencefalickou bariéru *in vitro*

4.1.1 PAMPA model

4.1.1.1 Validace a testování standardních látek

Metodou PAMPA byl otestován set 20 standardních látek. Do výběru byla zařazena klinicky využívaná léčiva, u kterých je známá prostupnost do CNS *in vivo* (Di et al. 2003; Yoon et al. 2006; Crivori et al. 2000; Wang et al. 2005). Standardní látky byly klasifikovány do dvou skupin dle své schopnosti prostoupit do CNS *in vivo* na CNS- (látky do CNS neprostupující) a CNS+ (látky do CNS prostupující). Ze skupiny CNS+ bylo otestováno 13 látek a ze skupiny CNS- 7 látek. Výsledkem měření množství látky prostupující přes membránu v čase je koeficient Pe. V grafu (Obrázek 13) je ilustrativně zobrazen nárůst koncentrace látky (donepezil) v akceptorovém a pokles koncentrace látky v donorovém kompartmentu v průběhu experimentu. Výsledky testování standardních látek jsou uvedeny v Tabulka 2.



Obrázek 13 – Změna koncentrace donepezilu v akceptorovém a donorovém kompartmentu v čase. Hodnoty koncentrace byly získány z kalibrační křivky po změření absorbance, počáteční koncentrace donepezilu v donorovém kompartmentu byla 100 µM.

Tabulka 2 - Porovnání výsledků testování standardních látek metodou PAMPA *s in vivo* CNS dostupností klinicky užívaných léčiv. Klasifikace látek dle Pe: látky CNS+ mají $Pe \geq 4,0 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$, látky CNS- mají $Pe \leq 2,0 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$, látky s Pe $2,0 - 4,0 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ nelze přesně specifikovat (Di et al. 2003). Pe koeficient je vyjádřen jako průměr n nezávislých měření \pm SEM. * označené látky se vzájemně neshodují v CNS+/- klasifikaci *in vivo* a dle naměřených koeficientů. LogD byl získán z Chemspider (spočítán pomocí ACD/Labs Percepta Platform – PhysChem Module).

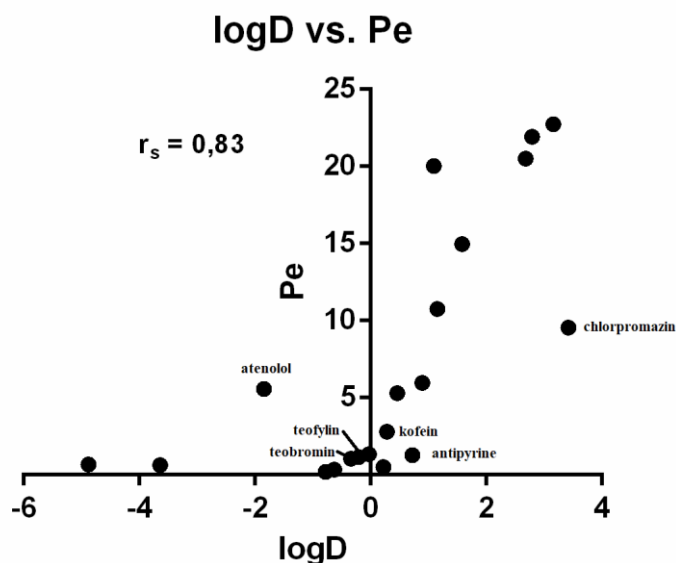
Testovaná látka	n	<i>in vivo</i> CNS+/-	logD (pH = 7,4)	Pe \pm SEM	CNS +/- dle Pe
antipyrin*	3	CNS+	0,72	1,3 \pm 0,33	CNS-
donepezil	6	CNS+	2,79	22 \pm 2,1	CNS+
dezipramin	3	CNS+	1,58	15 \pm 3,5	CNS+
chlorpromazin	3	CNS+	3,42	9,6 \pm 1,6	CNS+
imipramin	3	CNS+	2,68	21 \pm 1,9	CNS+
kofein*	3	CNS+	0,28	2,8 \pm 0,43	CNS+/-
piroxikam	4	CNS+	0,46	5,3 \pm 1,1	CNS+
propranolol	3	CNS+	1,15	11 \pm 0,41	CNS+
rivastigmin	6	CNS+	1,09	20 \pm 2,1	CNS+
takrin	8	CNS+	0,89	6,0 \pm 0,58	CNS+
teobromin*	3	CNS+	-0,34	1,1 \pm 0,04	CNS-
teofylin*	3	CNS+	-0,03	1,4 \pm 0,59	CNS-
testosteron	3	CNS+	3,16	23 \pm 4,3	CNS+
atenolol*	3	CNS-	-1,85	5,6 \pm 0,84	CNS+
cefuroxim	3	CNS-	-3,64	0,63 \pm 0,16	CNS-
furosemid	3	CNS-	-0,78	0,19 \pm 0,07	CNS-
chlorotiazid	3	CNS-	-0,21	1,2 \pm 0,54	CNS-
ranitidin	3	CNS-	-0,63	0,35 \pm 0,31	CNS-
obidoxim	3	CNS-	-4,88	0,68 \pm 0,09	CNS-
sulfasalazin	3	CNS-	0,22	0,52 \pm 0,43	CNS-

Výsledné rozdělení látek na CNS+ a CNS-, dle naměřených koeficientů Pe se liší u 5 látek oproti situaci *in vivo*. * označené látky mají odlišnou *in vivo* a naměřenou CNS

dostupnost. Teofylin je *in vivo* CNS+ a jeho koeficient Pe naměřený metodou PAMPA odpovídá CNS-, stejně tak jako u teobrominu a antipyrinu. U atenololu je situace opačná, Pe koeficient řadí toto CNS- léčivo mezi CNS+. Kofein, látka působící v CNS, se dle naměřených hodnot vyskytuje na pomezí CNS+ a CNS-.

4.1.1.2 Korelace logD s koeficientem Pe

Distribuční koeficient logD (pH=7,4) udává, jak se látka s ohledem na ionizaci jejích funkčních skupin dělí mezi dvě fáze oktanol a vodu. LogD byl získán z Chemspider (spočítán pomocí ACD/Labs Percepta Platform – PhysChem Module). Čím vyšší je hodnota tohoto koeficientu, tím hůře se látka rozpouští ve vodné fázi při daném pH. Korelace logD u standardních látek s koeficienty Pe naměřenými metodou PAMPA je znázorněna v grafu (Obrázek 14). Spearmanův korelační koeficient mezi logD a Pe $r_s = 0,83$. Obecně platí, že nižší hodnoty Pe by měly korelovat s nízkým logD a naopak, protože u lipofilnějších látek stoupá prostupnost skrze lipidovou membránu (Pe), zatímco u látek s nízkým logD se dá očekávat horší prostup. Tomuto tvrzení nejméně odpovídají výsledky naměřeného koeficientu Pe pro atenolol. Ačkoliv je jeho logD velmi nízký (-1,85), tak jeho Pe (5,6) odpovídá CNS+ látkám. Tento nesprávný výsledek naměřený metodou PAMPA významně snižuje hodnotu korelace metody PAMPA s logD koeficientem (korelační koeficient r_s bez atenololu by byl 0,90).



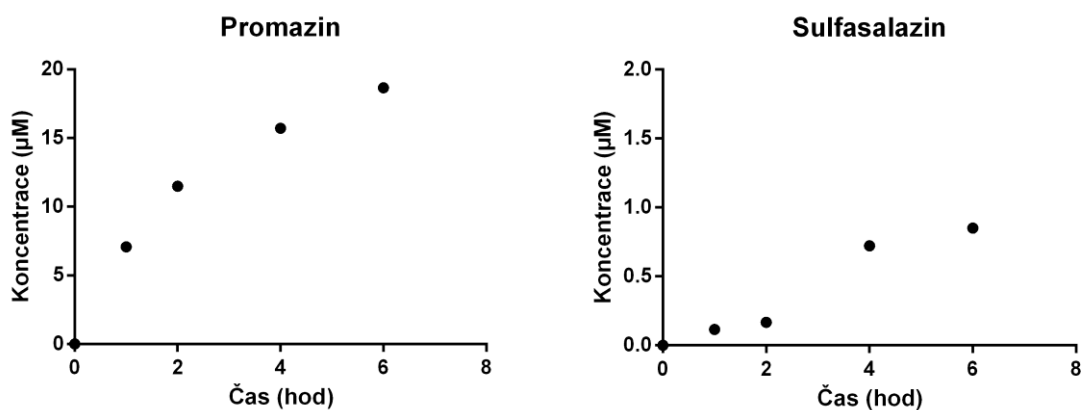
Obrázek 14 – Korelace logD a Pe pro jednotlivé standardní látky měřené metodou PAMPA. Statisticky byla data vyhodnocena pomocí Spearmanovy korelace. Spearmanův korelační koeficient $r_s = 0,83$ ($p \leq 0,05$).

4.1.2 MDCK buněčný model

4.1.2.1 Validace MDCK metody a testování standardních látek

Nově zavedená metoda využívající MDCK buněčnou monovrstvu byla validována testováním standardních látek. Bylo otestováno 20 standardních látek. Do výběru byla opět zařazena klinicky využívaná léčiva, u kterých je známá prostupnost do CNS *in vivo* (Di et al. 2003; Yoon et al. 2006; Crivori et al. 2000; Wang et al. 2005). Standardní látky byly klasifikovány do dvou skupin dle své schopnosti prostoupit do CNS *in vivo* na CNS-, a CNS+. Ze skupiny CNS+ bylo otestováno 13 látek a ze skupiny CNS- 7 látek. Výsledkem měření koncentrace látky prostupující přes membránu v čase je koeficient Papp, což je aparentní permeační koeficient udávající teoretickou prostupnost látek přes HEB. Na Obrázek 15 je ilustrativně zobrazen nárůst koncentrace látky s dobrou prostupností (promazin) a látky špatně prostupující (sulfasalazin), pro znázornění odlišnosti v kinetice prostupu. Výsledky testování standardních látek jsou uvedeny v Tabulka 3. Pro kontrolu integrity monovrstvy byl na konci experimentu změřen procentuální přístup FITC-dextranu z donorového kompartmentu do akceptorového. Hodnoty FITC-dextranu změřené v akceptorovém kompartmentu

se pohybovaly v rozmezí 0–0,87 %. Jednotlivé jamky, kde číslo přesáhlo 1 % byly z experimentu vyřazeny. Experimentálně zjištěná hodnota TEER v den experimentu byla mezi 800–950 $\Omega \times \text{cm}^2$ pro veškeré experimenty.



Obrázek 15 - Nárůst koncentrace látek v akceptorovém kompartmentu v čase pro CNS+ (promazin) a CNS- (sulfasalazin) standardní látky. Hodnoty koncentrace byly získány z kalibrační křivky po změření absorbance při počáteční koncentraci 50 μM (promazin) a 100 μM (sulfasalazin).

Tabulka 3 – Porovnání výsledků testování standardních látek metodou MDCK *s in vivo* CNS dostupností klinicky užívaných léčiv. Papp koeficient je vyjádřen jako průměr n nezávislých měření \pm SEM $\times 10^{-6}$ cm \times s⁻¹. * označené látky se vzájemně neshodují v CNS+/- klasifikaci *in vivo* a dle naměřených koeficientů. LogD byl získán z Chemspider (spočítán pomocí ACD/Labs Percepta Platform – PhysChem Module).

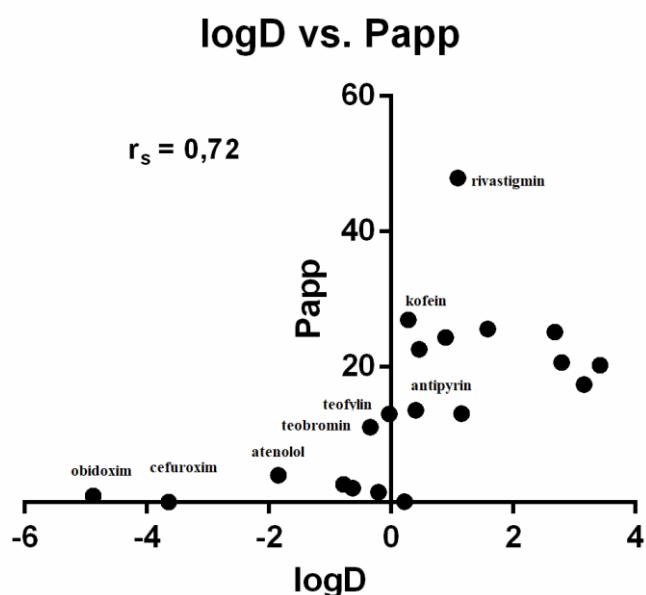
Testovaná látka	n	<i>in vivo</i> CNS+/-	logD	Papp \pm SEM	CNS +/- dle Papp
antipyrin	3	CNS+	0,72	14 \pm 5,2	CNS+
donepezil	4	CNS+	2,79	21 \pm 3,4	CNS+
desipramin	3	CNS+	1,58	26 \pm 7,5	CNS+
chlorpromazin	3	CNS+	3,42	20 \pm 2,6	CNS+
imipramin	3	CNS+	2,68	25 \pm 1,4	CNS+
kofein	3	CNS+	0,28	27 \pm 3,5	CNS+
piroxikam	3	CNS+	0,46	23 \pm 2,8	CNS+
propranolol	3	CNS+	1,15	13 \pm 6,3	CNS+
rivastigmin	3	CNS+	1,09	48 \pm 2,6	CNS+
takrin	3	CNS+	0,89	24 \pm 2,2	CNS+
teobromin	3	CNS+	-0,34	11 \pm 3,3	CNS+
teofylin	3	CNS+	-0,03	13 \pm 2,7	CNS+
testosteron	3	CNS+	3,16	17 \pm 4,0	CNS+
atenolol	3	CNS-	-1,85	4,1 \pm 0,89	CNS+/-
cefuroxim	3	CNS-	-3,64	0,09 \pm 0,07	CNS-
furosemid	3	CNS-	-0,78	2,7 \pm 0,80	CNS-
chlorotiazid	3	CNS-	-0,21	1,5 \pm 1,4	CNS-
obidoxim	3	CNS-	-4,88	0,98 \pm 0,21	CNS-
ranitidin	3	CNS-	-0,63	2,1 \pm 0,83	CNS-
sulfasalazin	3	CNS-	0,22	0,10 \pm 0,07	CNS-

Jak bylo experimentálně zjištěno, výsledné koeficienty Papp se u CNS- léčiv pohybují v hodnotách blízkých nule. U CNS+ léčiv jsou měření zjištěné hodnoty vyšší než 10×10^{-6} cm \times s⁻¹. V literatuře se uvádí pro CNS- Papp $\leq 3,0 \times 10^{-6}$ cm \times s⁻¹, pro CNS+ Papp $\geq 3 \times 10^{-6}$ cm \times s⁻¹ (Wang et al. 2005). CNS klasifikace pomocí Papp pro měřené standardní látky odpovídá *in vivo* CNS dostupnosti s výjimkou atenololu, který

se svým Papp 4,1 řadí k látkám, u kterých není možné s jistotou predikovat CNS dostupnost, tedy CNS+/- . Hodnoty Papp zjištěné v našich experimentálních podmínkách jsou u všech CNS+ standardních látek nad 10. Z tohoto důvodu je atenolol měřený v těchto podmínkách zařazen mezi CNS+/-, ačkoliv hodnota jeho $Papp \geq 3 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ by dle literatury odpovídala již CNS+.

4.1.2.2 Korelace logD s koeficientem Pe

Korelace logD standardních látek a hodnot koeficientů Papp je znázorněna v grafu (Obrázek 16). Korelační koeficient mezi logD a Papp $r_s = 0,72$. Můžeme zde pozorovat mírný pokles korelace v porovnání s PAMPA metodou. Za snížení koeficientu r_s stojí zejména látky antipyrin, kofein, teofylin a teobromin, které mají nízké hodnoty logD avšak buněčnou monovrstvou prochází dobře a svými Papp se tak řadí k CNS+ látkám. Mezi další odlehlejší body v grafu korelace patří rivastigmin, který má logD 1,09 a vysoký koeficient Papp 48 a také látky s výrazně nízkými hodnotami logD, obidoxim a cefuroxim. U atenololu lze pozorovat v porovnání s předchozí korelací (log D a Pe) snížení disproporce mezi hodnotami log D a Papp.



Obrázek 16 – Korelace logD a Papp po jednotlivé standardní látky. Statisticky byla data vyhodnocena pomocí Spearmanovy korelace. Spearmanův korelační koeficient $r_s = 0,72$ ($p \leq 0,05$).

4.1.3 Korelace mezi PAMPA a MDCK metodou

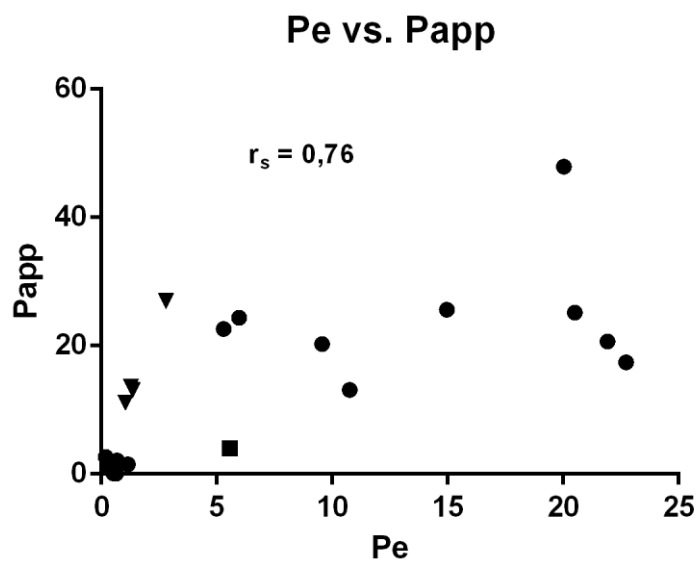
Porovnání hodnot koeficientů Pe pro model PAMPA a $Papp$ pro model využívající MDCK buněčnou linii je uvedeno v Tabulka 4.

Tabulka 4 - Porovnání standardních látek testovaných pomocí PAMPA a MDCK modelu. Hodnoty $Pe \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ a $Papp \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ jsou zobrazeny jako průměr n měření (viz. Tabulka 2, Tabulka 3) \pm SEM. * označené látky se vzájemně neshodují v CNS \pm klasifikaci dle naměřených koeficientů.

Testovaná látka	PAMPA (Pe)	MDCK ($Papp$)
antipyrin*	1,3 \pm 0,33	14 \pm 5,2
donepezil	22 \pm 2,1	21 \pm 3,4
desipramin	15 \pm 3,5	26 \pm 7,5
chlorpromazin	9,6 \pm 1,6	20 \pm 2,6
imipramin	21 \pm 1,9	25 \pm 1,4
kofein*	2,8 \pm 0,43	27 \pm 3,5
piroxikam	5,3 \pm 1,1	23 \pm 2,8
propranolol	11 \pm 0,41	13 \pm 6,3
rivastigmin	20 \pm 2,1	48 \pm 2,6
takrin	6,0 \pm 0,58	24 \pm 2,2
teobromin*	1,1 \pm 0,04	11 \pm 3,3
teofylin*	1,4 \pm 0,59	13 \pm 2,7
testosteron	23 \pm 4,3	17 \pm 4,0
atenolol*	5,6 \pm 0,84	4,1 \pm 0,89
cefuroxim	0,63 \pm 0,16	0,09 \pm 0,07
furosemid	0,19 \pm 0,07	2,7 \pm 0,80
chlorotiazid	1,2 \pm 0,54	1,5 \pm 1,4
obidoxim	0,35 \pm 0,31	0,98 \pm 0,21
ranitidin	0,68 \pm 0,09	2,1 \pm 0,83
sulfasalazin	0,52 \pm 0,43	0,10 \pm 0,07

Hvězdičkou (*) označené standardní látky se vzájemně neshodují v konečné CNS+/- klasifikaci dle jejich koeficientů. Jedná se o kofein, který je metodou PAMPA s Pe 2,8 klasifikován jako CNS- a metodou MDCK s Papp 27 jako CNS+, to samé lze pozorovat u teofylinu, který má hodnotu Pe 1,4 a Papp 13, a teobrominu s Pe 1,1 a Papp 11. Tato léčiva *in vivo* do mozku prostupují a metoda MDCK je tedy charakterizovala správněji než PAMPA. U atenololu došlo k posunu z CNS+ na CNS+/- v případě PAMPA metody vs. metody s MDCK, což značí u MDCK metody přiblížení *in vivo* situaci.

Korelace mezi těmito dvěma koeficienty je zobrazena v grafu (Obrázek 17). Korelační koeficient $r_s = 0,76$. Odlehle hodnoty tvoří látky, jejichž koeficienty vzájemně málo korelují, což může být způsobeno např. přítomností jiného než pasivního transportu skrz membránu na základě lipofility. Výhradně pasivní transport platí pro metodu PAMPA, zatímco MDCK monovrstva disponuje enzymy a transportéry, které mohou ovlivnit prostup látek, a proto zde vznikají rozdíly v predikci dostupnosti v CNS. Obecně lze říci, že odlehlejší body směrem doleva a nahoru tvoří látky s podílem aktivního transportu (trojúhelníkem označené body v grafu pro kofein, teofylin, teobromin a antipyren). Naopak látky vpravo dole mohou být ovlivněné efluxními mechanismy, v grafu (Obrázek 17) označené čtvercem (atenolol) (Wang et al. 2005).



Obrázek 17 – Korelace mezi koeficienty Papp a Pe pro jednotlivé standardní látky. Statisticky byla data vyhodnocena pomocí Spearmanovy korelace. Spearmanův korelační koeficient $r_s = 0,76$ ($p \leq 0,05$). Látky, jejichž koeficienty vzájemně nekorelují jsou označeny ▼ (kofein, teofylin, teobromin, antipyrine) a ■ (atenolol).

4.1.4 D3 buněčný model

D3 buněčnou linii využívající model byl validován pomocí standardních látek, u kterých je známá prostupnost *in vivo* a také otestovaná *in vitro* CNS permeabilita pomocí modelů PAMPA a MDCK. Na hCMEC/D3 buněčném modelu byl otestován set 13 standardních látek se známou CNS dostupností (Di et al. 2003; Yoon et al. 2006; Crivori et al. 2000; Wang et al. 2005). 7 látek *in vivo* CNS+ a 6 látek *in vivo* CNS-. Výsledné hodnoty Papp jsou uvedeny v Tabulka 5.

Tabulka 5 – Výsledky testování standardních látek metodou hCMEC/D3 *s in vivo* CNS dostupností klinicky užívaných léčiv u lidí a jejich klasifikace mezi CNS+ a CNS- dle hodnot koeficientů Papp. Hodnoty Papp $\times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ jsou zobrazeny jako průměr n měření \pm SEM.

Testovaná látka	n	<i>in vivo</i> CNS+/-	Papp \pm SEM	CNS +/- dle Papp
antipyrin	3	CNS+	17 \pm 1,8	CNS+
donepezil	4	CNS+	24 \pm 2,8	CNS+
kofein	4	CNS+	28 \pm 2,1	CNS+
propranolol	5	CNS+	23 \pm 2,1	CNS+
rivastigmin	3	CNS+	29 \pm 4,6	CNS+
takrin	3	CNS+	24 \pm 2,3	CNS+
teobromin	3	CNS+	21 \pm 0,91	CNS+
teofylin	4	CNS+	18 \pm 3,4	CNS+
atenolol	4	CNS-	11 \pm 2,6	CNS-
furosemid	3	CNS-	14 \pm 0,92	CNS-
obidoxim	4	CNS-	14 \pm 0,52	CNS-
sulfasalazin	3	CNS-	11 \pm 1,9	CNS-

Koeficienty Papp standardních testovaných látek se pohybují v rozmezí od 11 do 29. Tato čísla jsou v porovnání s MDCK metodou vyšší. Látky skrz monovrstvu hCMEC/D3 buněk tedy prostupují rychleji a snáze, což může být v důsledku nízkého TEER u tohoto modelu. CNS+ *in vivo* látky mají koeficienty blízcí se hodnotě 17 a více, CNS- látky přibližně mezi hodnotami 11 a 14. Dle testování standardních látek můžeme říci, že látky hodnoty Papp nižší než 14 nemají potenciál do CNS prostoupit, a naopak látky nad 17 jsou považovány za CNS+. V tomto setu léčiv nebyl pozorován žádný rozpor mezi *in vivo* CNS dostupností a naměřenými hodnotami.

Do validace metody bylo zařazeno také měření látek, které jsou považovány za markery integrity membrány. Lucifer Yellow (LY) byl použit jako marker integrity membrány s nízkou permeabilitou, pomocí kterého je možné posoudit paracelulární transport. Jako marker fungujícího transcelulárního transportu a vysoké permeability

byl použit propranolol. LY, jehož prostup by měl být velmi nízký a prokázal nejnižší Papp (10). Naopak propranolol, u kterého je očekávaný výrazný prostup buněčnou monovrstvou se řadí k látkám s hodnotou Papp nad 20 (23).

Měření TEER v průběhu kultivace udržovalo od druhého až třetího dne své hodnoty v rozmezí 35–44 $\Omega \times \text{cm}^2$, které dále zůstávaly beze změny.

4.1.5 Porovnání *in vitro* modelů pro predikci CNS dostupnosti

Pro porovnání modelů PAMPA, MDCK a hCMEC/D3 bylo vybráno 13 standardních látek, které byly testovány všemi třemi modely, mezi kterými byly i marker vysoké permeability (propranolol) a marker nízké permeability (LY). Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 6.

Tabulka 6 – Porovnání koeficientů $Pe \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ pro PAMPA metodu, $Papp \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ pro buněčné modely, MDCK a D3. Koeficienty jsou spočítány z průměru n měření \pm SEM uvedených u jednotlivých tabulek testování standardních látek (Tabulka 2, Tabulka 3,

Tabulka 5). Zeleně zbarvené kolonky jsou látky odpovídající CNS+ *in vivo* i dle koeficientů pro jednotlivé modely, červeně zbarvené jsou CNS-, žlutá barva je pro látky s nejistou predikcí CNS+/-.

Testovaná látka	<i>in vivo</i>	PAMPA	MDCK	D3
Antipyrin	CNS+	1,3 \pm 0,3	14 \pm 5,2	19 \pm 1,9
Donepezil	CNS+	22 \pm 2,1	21 \pm 3,4	24 \pm 2,8
Kofein	CNS+	2,8 \pm 0,4	27 \pm 3,5	28 \pm 2,1
Propranolol	CNS+	11 \pm 0,4	13 \pm 6,3	23 \pm 2,1
Rivastigmin	CNS+	20 \pm 2,1	46 \pm 1,7	29 \pm 4,6
Tacrine	CNS+	6,0 \pm 0,6	21 \pm 3,4	23 \pm 2,0
Teobromin	CNS+	1,1 \pm 0,0	11 \pm 3,3	21 \pm 0,9
Teofylin	CNS+	1,4 \pm 0,6	13 \pm 2,7	18 \pm 3,4
Atenolol	CNS-	5,6 \pm 0,8	4,1 \pm 0,9	14 \pm 0,2
LY	CNS-	0,1 \pm 0,0	3,0 \pm 2,4	10 \pm 0,4
Obidoxim	CNS-	0,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	14 \pm 0,5
Furosemid	CNS-	0,2 \pm 0,1	2,7 \pm 0,8	14 \pm 0,9
Sulfasalazin	CNS-	0,5 \pm 0,4	0,10 \pm 0,1	11 \pm 1,9

Celkem 7 látek z 13 má shodnou CNS klasifikaci *in vivo* dle koeficientů naměřených pomocí všech tří metod. Antipyrin byl klasifikován PAMPA metodou jako CNS-, což je odlišné od *in vivo* dostupnosti, i modelů s MDCK a D3, kde je považován za CNS+. To samé platí pro kofein, teofylin a teobromin. Atenolol, který je *in vivo* CNS- byl správně stanoven pouze metodou D3, zatímco MDCK metoda ho řadí mezi CNS+/- a PAMPA metoda dokonce mezi CNS+. Markery propranolol i LY odpovídají po změření všemi metodami dle předpokladu.

4.2 Testování *in vitro* a *in vivo* prostupu standardních a nově syntetizovaných reaktivátorů

Výsledky testování standardních a nově syntetizovaných reaktivátorů jsou uvedeny v Tabulka 7. Jednotlivé skupiny lze rozdělit dle počtu kvartérních dusíků v jejich struktuře. Standardní reaktivátory mají s výjimkou 2-PAM dva, monokvartérní reaktivátory jeden a nekvartérní tento dusík ve své struktuře neobsahují. Přítomnost nabitého dusíku je zásadní pro schopnost prostoupit přes membránu. Standardní reaktivátory (pralidoxim, obidoxim, methoxim, trimedoxim a HI-6) byly testovány metodou PAMPA i MDCK. Monokvartérní reaktivátory K1371, K1373, K1374, K1375 a K1385 byly testovány PAMPA metodou. K1371 a K1373 byly následně testovány i MDCK metodou, výsledky však prokazovaly negativní hodnoty a v testování série nebylo pokračováno. Vybrané monokvartérní reaktivátory s potenciálně nejlepšími vlastnostmi (reaktivační účinnost, spektrum účinku, cytotoxicita) byly vybrány pro verifikaci CNS dostupnosti pomocí *in vivo* farmakokinetické studie na myších. Jednalo se o látky K1371, K1374 a K1375. Z nekvartérních reaktivátorů byly testovány nově syntetizované K1278, K1279, K1280, K1281 metodou PAMPA i MDCK.

Tabulka 7 – Porovnání koeficientů Pe pro PAMPA metodu a Papp MDCK pro standardní a nově syntetizované reaktivátory $\times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$. Výsledné koeficienty jsou průměrem ze tří nezávislých měření \pm SEM (mimo K1371 a K1373 pro model MDCK, kde $n=2$). Klasifikace látek dle Pe: látky CNS+ mají $\text{Pe} \geq 4,0 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$, látky CNS- mají $\text{Pe} \leq 2,0 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$, látky s $\text{Pe} 2,0 - 4,0 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ nelze přesně specifikovat. Papp koeficienty jsou vztaženy k CNS+ a CNS- standardním léčivům a dle toho klasifikovány do CNS+ a CNS- skupiny. Látky označené * byly detekovány pomocí HPLC-MS.

Testovaná látka	PAMPA (Pe)	CNS klasifikace dle Pe	MDCK (Papp)	CNS klasifikace dle Papp
pralidoxim	$0,36 \pm 0,16$	CNS-	0,0	CNS-
obidoxim	$0,68 \pm 0,17$	CNS-	$0,98 \pm 0,21$	CNS-
methoxim	$0,25 \pm 0,13$	CNS-	0,0	CNS-
trimedoxim	$0,73 \pm 0,017$	CNS-	$0,40 \pm 0,20$	CNS-
HI-6	$0,84 \pm 0,19$	CNS-	0,0	CNS-
K1371	0,0	CNS-	0,0	CNS-
K1373	$0,6 \pm 0,15$	CNS-	0,3	CNS-
K1374	$0,37 \pm 0,16$	CNS-	N.T.	
K1375	$0,48 \pm 0,29$	CNS-	N.T.	
K1385	0,0	CNS-	N.T.	
K1278	$5,4 \pm 0,8$	CNS+	$32 \pm 5,0$ *	CNS+
K1279	$5,7 \pm 1,2$	CNS+	$21 \pm 7,8$ *	CNS+
K1280	$2,4 \pm 0,1$	CNS+/-	$1,5 \pm 1,2$ *	CNS-
K1281	$6,9 \pm 0,2$	CNS+	$11,6 \pm 1,8$ *	CNS+

Výsledné hodnoty Pe i Papp řadí testované standardní reaktivátory do skupiny CNS-, což zcela odpovídá i jejich nízkému *in vivo* prostupu. Monokvartérní reaktivátory byly klasifikovány jako CNS- metodou PAMPA a dva z nich (K1371 a K1373) byly hodnoceny jako CNS- i v případě testování MDCK metodou. Z nově syntetizovaných nekvartérních reaktivátorů prokázal potenciál prostoupit skrz HEB K1278, K1279 a K1281. U K1280 byl Pe ve skupině s neurčitou predikcí prostupnosti, zatímco Papp odpovídal CNS-. Skupiny kvartérních reaktivátorů s jedním i dvěma nabitými dusíky

ve své struktuře bez výjimky odpovídají CNS-, zatímco nekvartérní struktury vyjma jedné sloučeniny prokázaly potenciál do CNS prostoupit.

V rámci farmakokinetické in vivo studie vybraných (K1371, K1374, K1375) nově syntetizovaných monokvartérních reaktivátorů byl stanoven vstup do mozkové tkáně v dávce odpovídající 5 % LD₅₀. Jejich vstup do CNS byl však nižší než 1 % plazmatické koncentrace (data nejsou vizualizována).

4.3 Přístupy pro zvýšení transportu reaktivátorů acetylcholinesterázy do mozku

4.3.1 CACO-2 metoda pro posouzení interakce reaktivátorů acetylcholinesterázy s P-glykoproteinem

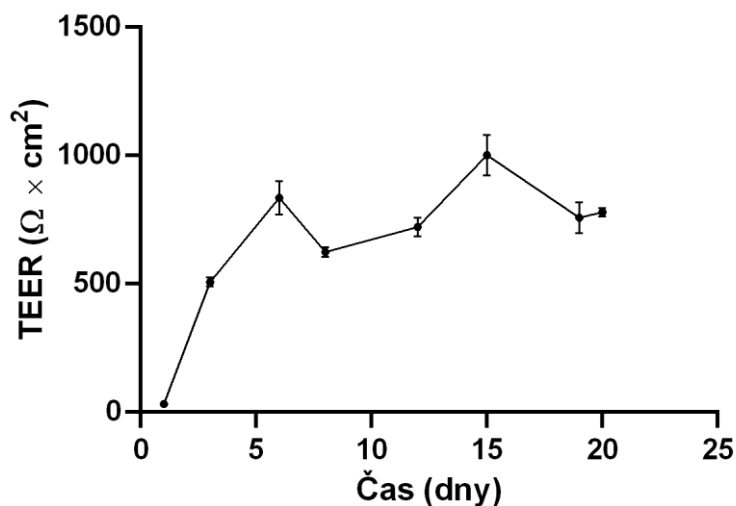
4.3.1.1 Validace CACO-2 metody a testování standardních látek

CACO-2 metoda byla zavedena pro studium interakce Pgp s testovanými látkami. CACO-2 buněčná linie stabilně exprimuje Pgp na své apikální části. K validaci modelu využívajícího CACO-2 buněčnou linii byl vybrán substrát Pgp R123, který je pomocí Pgp transportován zpět do donorové části transwellu. Pro posouzení faktu, zda je testovaná látka substrátem Pgp, je sledován transport ve směru AB (apikálně-basolaterální) i BA (basolaterálně-apikální), a výsledek je uveden jako TR (BA:AB). Tento transport je pro substráty Pgp asymetrický (ve směru BA prostupují lépe než ve směru AB), což testovaný standardní substrát Pgp R123 s hodnotou TR = 4,5 prokázal. Po přidání inhibitoru Pgp verapamilu byl tento transportér zablokovan, což mělo vliv na transport R123, ve smyslu snížení asymetrie BA:AB, výsledná hodnota TR po zablokování byla 1,3. Asymetrický vstup R123 je znázorněn v grafu (Obrázek 19).

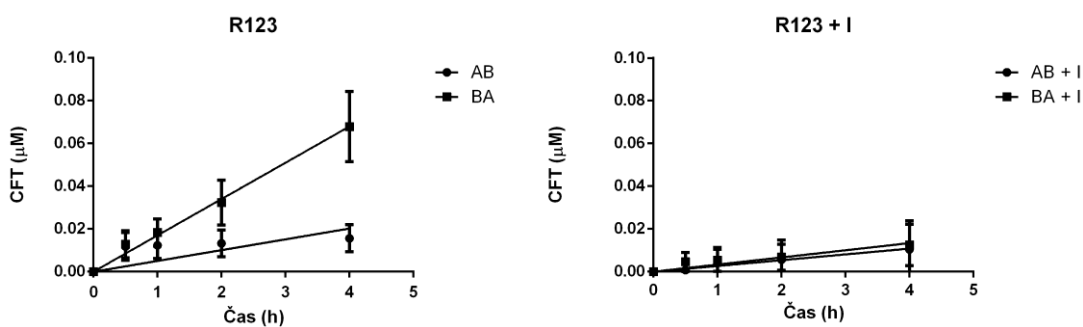
Pro posouzení permeability monovrstvy byl opět otestován propranolol (Papp = 23) jako marker vysoké permeability a LY (Papp = 0,07) jako marker nízké permeability.

Pro potvrzení integrity buněčné monovrstvy byl po celou dobu růstu měřen TEER. Názorný vývoj TEER v průběhu kultivace je uveden v grafu (Obrázek 18). Hodnoty v prvních dnech kultivace stoupají až do 18. dne, kdy dojde k ustálení. Průměrný TEER změřený ve 20. dni byl vyšší než 600 $\Omega \times \text{cm}^2$ ve všech experimentech. Po dokončení

experimentu byla provedena kontrola integrity monovrstvy pomocí FITC-dextranu, kdy po dokončení 60 min inkubace jeho množství nepřesáhlo 1 % původní donorové koncentrace.



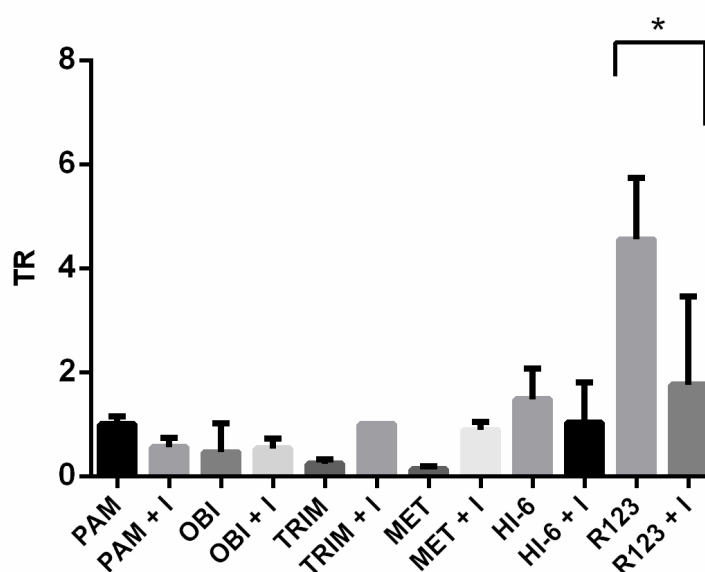
Obrázek 18 – Vývoj transendotheliálního odporu (TEER) měřeného v průběhu kultivace po jednu destičku. Body jsou průměrem z n měření \pm SD (n = 12).



Obrázek 19 – V grafu je znázorněno kumulativní množství (CFT, z ang. Cumulative Fraction Transported) R123 v μM stoupající v akceptorovém kompartmentu v čase pro oba směry. Po inkubaci s inhibítozem Pgp, verapamilem (I), byl rozdíl mezi BA a AB téměř eliminován. Body jsou průměrem z n měření \pm SD (n=3).

4.3.2 Posouzení interakce standardních reaktivátorů acetylcholinesterázy s P-glykoproteinem

Pro studium interakce reaktivátorů s Pgp bylo otestováno metodou CACO-2 5 standardních reaktivátorů (pralidoxim, obidoxim, methoxim, trimedoxim a HI-6) a kontrolní standardní substrát Pgp R123. Jejich výsledné hodnoty Papp v obou směrech jsou uvedeny v Tabulka 8. Jako inhibitor byl použit verapamil. TR testovaných reaktivátorů a kontroly R123 jsou znázorněny v grafu (Obrázek 20).



Obrázek 20 – Hodnoty TR testovaných standardních oximových reaktivátorů (PAM = pralidoxim, OBI = obidoxim, TRIM = trimedoxim, MET = metoxim) s/bez inhibitoru verapamilu (I). Data jsou znázorněna jako průměr 3 měření \pm SD. Statistické vyhodnocení proběhlo pomocí jednocestné ANOVY a Sidack testu pro stanovení signifikantního rozdílu ($p \leq 0,05$) mezi TR s/bez inhibitoru. Hodnoty TR vyšší než 2 řadí látku mezi Pgp substráty.

Tabulka 8 – Hodnoty Papp koeficientů ve směru AB a ve směru BA s/bez inhibitoru pro testované látky jsou vyjádřeny jako průměr tří měření \pm SEM.

Testovaná látka	AB	BB	AB + I	BA + I
Pralidoxime	0,82 \pm 0,35	0,79 \pm 0,31	1,52 \pm 0,50	0,95 \pm 0,46
Obidoxime	0,40 \pm 0,18	0,22 \pm 0,27	0,26 \pm 0,29	0,11 \pm 0,18
Trimedoxime	1,02 \pm 0,48	0,29 \pm 0,28	0,28 \pm 0,31	0,28 \pm 0,31
Methoxime	0,90 \pm 0,56	0,16 \pm 0,23	0,09 \pm 0,18	0,07 \pm 0,16
HI-6	0,47 \pm 0,28	0,76 \pm 0,39	0,54 \pm 0,64	0,24 \pm 0,14
R123	0,88 \pm 0,25	4,5 \pm 0,46	0,34 \pm 0,21	0,43 \pm 0,30

Výsledné koeficienty *Papp* jsou u všech reaktivátorů podobné. Koeficienty *Papp* se blíží nule, což ukazuje na nízký transport přes monovrstvu. Vyrovnané hodnoty ve směru AB a BA naznačují, že k interakci reaktivátorů s Pgp nedochází. TR u žádného z testovaných reaktivátorů nepřesáhl hodnotu 2. Po zablokování Pgp inhibitorem verapamilem se hodnoty nikak významně nezměnily. Dle naměřených výsledků můžeme říct, že žádný z reaktivátorů neinteraguje s efluxním transportérem Pgp.

4.3.3 *In vitro* stanovení penetrace diamantových nanočástic

Diamantové nanočástice (ND) slouží jako nosiče, na které jsou navázána léčiva. Tyto nosiče ovlivňují pevnost HEB pomocí interakcí s TJs a mohou tak zvýšit paracelulární transport látek do CNS (Setyawati et al. 2016). Metodou MDCK byl změřen prostup ND s navázanou oximovou skupinou. ND byly měřeny ve dvou koncentracích, 10 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$. Naměřené koeficienty jsou uvedeny v Tabulka 9.

Tabulka 9 – Koeficienty *Papp* pro různé koncentrace (10 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ a 100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) De-3 nanočástic. Koeficienty jsou spočítány z průměru 3 měření \pm SEM.

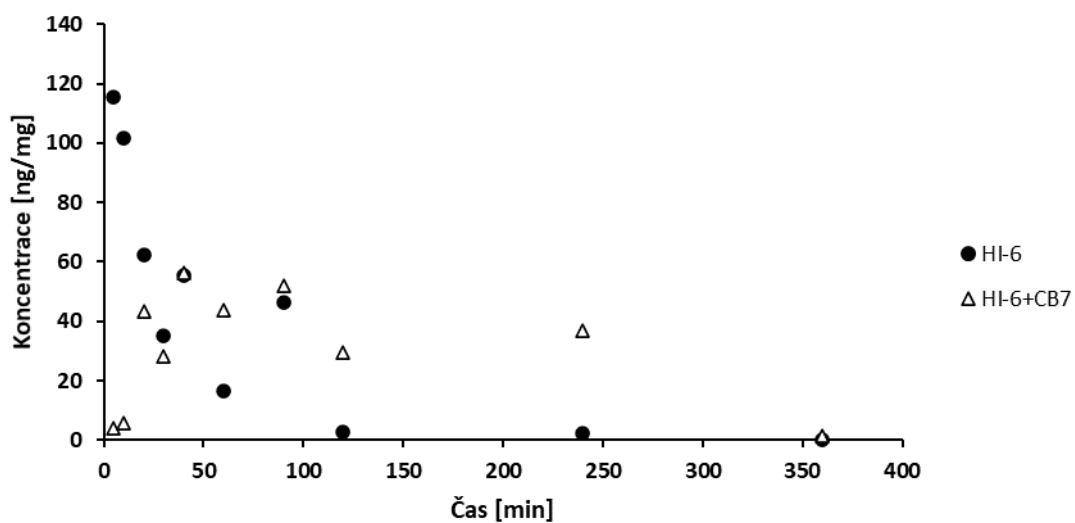
Testovaná látka (koncentrace)	<i>Papp</i> \pm SEM	CNS +/-
De-3 (10 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)	15 \pm 1,1	CNS +
De-3 (100 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)	4,7 \pm 2,5	CNS +

Obě koncentrace ND prokázaly potenciál do mozku prostoupit. Jejich koeficienty Papp jsou srovnatelné s CNS+ standardními léčivy. Koncentrace $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ prostupovala monovrstvou lépe než koncentrace vyšší. Pilotní experiment studující intracelulární akumulaci ND v buněčné monovrstvě prokázal, že ND mají tendenci se v buňkách zadržovat. V koncentraci $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ bylo zjištěno, že se ND akumulují v buněčné monovrstvě až z 30 %, oproti 13 % pro koncentraci $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$. Integrita monovrstvy testovaná prostupem FITC-dextranu nebyla nijak významně narušena, v akceptorové části bylo nalezeno méně než 1 % původní koncentrace FITC-dextranu. MTT test pro hodnocení cytotoxicity ND vyhodnotil tyto částice v daných koncentracích jako netoxické (data nejsou uvedena).

4.3.4 *In vivo* stanovení penetrace reaktivátorů acetylcholinesterázy do CNS navázaných na cucurbit[7]urilové nanočástice

CB[7] makrocyclické nanočástice mají potenciál zvýšit terapeutickou účinnost a CNS dostupnost enkapsulovaných látek. CB[7] jsou schopné procházet přes biologické membrány a zvyšovat rozpustnost a stabilitu navázaných látek (Montes-Navajas et al. 2009; Andrýs et al. 2020). Reaktivátor HI-6 navázaný na CB[7] nanočástice (HI-6@CB[7]) byl testován *in vivo* na myších. Komplex HI-6@CB[7] byl aplikován zvířeti a v čase byl sledován jeho prostup do mozku. Koncentrace v mozkové tkáni byla měřena pomocí UHPLC-MS. Grafické znázornění farmakokinetiky HI-6 a HI-6@CB[7] je uvedeno na Obrázek 21.

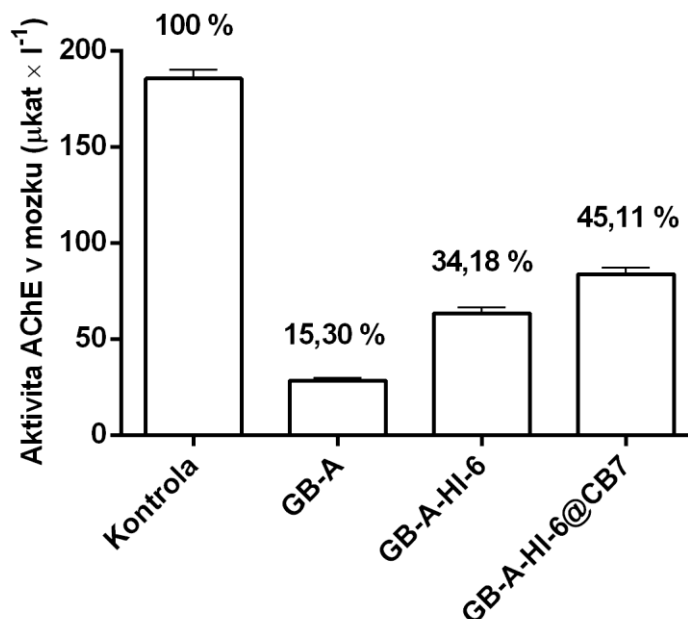
Mozek



Obrázek 21 – Stanovené koncentrace v $\text{ng} \times \text{mg}^{-1}$ HI-6 nevázané a HI-6@CB[7] v mozkové tkáni myši pro odběry v různých časových bodech

Tabulka 10 – Farmakokinetický parametr AUC (plocha pod křivkou) po podání ekvimolárního množství HI-6 nevázané a HI-6@CB[7]. AUC v plazmě je uvedena pro úplnost dat, její stanovení nebylo součástí této práce.

AUC			
	HI-6	HI-6@CB[7]	Poměr
Mozek	4553,0	14516,0	1:3,2
Plazma	842,4	2779,0	1:3,3



Obrázek 22 - Změny aktivity AChE ($\mu\text{kat} \times \text{l}^{-1}$) 60 min po intoxikaci sarinem v LD_{50} ($144 \mu\text{g} \times \text{kg}^{-1}$, i.m.) a podání HI-6 nevázané a HI-6@CB[7] ($48 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) s atropinem ($10 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$) v mozku myši ($n=6$). Reaktivační účinnost je uvedena pro úplnost dat, její stanovení nebylo součástí této práce. GB – sarin, A – atropin.

Vazba HI-6 na CB[7] změnila farmakokinetický profil tohoto reaktivátoru v mozkové tkáni myši. Vázaná HI-6 zapříčinila pomalejší nárůst koncentrace s prodlouženou eliminací jak v mozku tak v plasmě. Tím se zvýšila AUC reaktivátoru v mozkové tkáni a zvýšila se tak jeho biodostupnost. Obdobně se v případě HI-6@CB[7] zvýšila AUC v plasmě oproti volné HI-6 a byla téměř 7krát vyšší v porovnání se situací v mozku. Reaktivační účinnost HI-6@CB[7] podané s atropinem na mozkovou AChE u myši se zvýšila z původních 34 % po podání samostatné HI-6 na 45 % (Obrázek 22).

5. Diskuze

In vitro metody jsou nepostradatelnou součástí rané fáze výzkumu nových potenciálních léčiv interagujících s organismem člověka. Vyplňují pomyslnou mezeru mezi počítačovou technikou, tedy návrhem a studiem vlastností látek *in silico* a využíváním živých zvířat, experimenty *in vivo*. Jejich využití má největší potenciál v oblasti screeningu nových látek, které mohou být potenciálními léčivy, kdy by testování rozsáhlého souboru znamenalo velkou spotřebu laboratorních zvířat a odhad jejich biologických vlastností pomocí softwaru není v tomto případě dostačující. Platí to i pro námi zkoumanou oblast predikce schopnosti látek překonat HEB. Stanovení této vlastnosti je důležité zejména pro látky, které mají svůj cíl v CNS. Mimo studium látek interagujících se strukturami mozku je stanovení této schopnosti nepostradatelné pro veškeré látky, u kterých vliv na CNS žádoucí není a může být příčinou vzniku vedlejších účinků.

Tato dizertační práce byla zaměřena na výběr, vývoj, optimalizaci a validaci metodik pro *in vitro* predikci prostupnosti látek s cílem testovat nově syntetizované potenciální reaktivátory AChE. Hodnoceny byly jak standardní, tak nově syntetizované látky z této skupiny. Dílčím cílem pak byla studie možnosti zvýšení prostupu reaktivátorů do mozku. Zde práce přesahuje i do *in vivo* oblasti, kdy byla využita laboratorní zvířata pro posouzení způsobů zlepšujících penetraci do CNS.

5.1 *In vitro* metody pro predikci průchodu látek do CNS

Jak bylo uvedeno v teoretické části, prakticky žádný z doposud zavedených modelů HEB nemůže dokonale napodobit fyziologické podmínky *in vivo*. Výběrem vhodného modelu HEB a co nejpřesnější interpretací dat však můžeme získat cenné informace o vlastnostech látek a ušetřit tak čas a náklady při vývoji léčiva. Pokud známe výhody a nevýhody jednotlivých modelů můžeme zvolit ten, který je pro naše testování nejideálnější. *In vitro* modely jsou tak nenahraditelnou součástí výzkumu HEB a vývoje nových léčiv. Při vývoji nových látek je nezbytné provádět tzv. high-throughput screening, kdy je testováno velké množství nových chemických entit za účelem vyselektovat ty, které mají potenciál do CNS prostoupit. Významnými vlastnostmi pro screeningové metody prostupnosti látek přes HEB *in vitro* jsou cenová dostupnost a jednoduchost použití. I přes nedokonalosti immortalizovaných buněčných linií korelují

na nich získaná data s vlastnostmi látek *in vivo* velmi dobře (Garberg et al. 2005; He et al. 2014). Imortalizované buněčné linie jsou relativně jednoduché na manipulaci a cenově dostupné v porovnání se složitějšími buněčnými modely a jejich výhodou oproti nebuněčným modelům je, že zahrnují navíc i aktivní děje přítomné v živých buňkách.

Základem pro vývoj metod, u kterých látka prostupuje z jedné části destičky do druhé přes membránu, která simuluje HEB, byla na našem pracovišti metoda PAMPA. Tato metoda využívá jako model HEB prasečí mozkové fosfolipidy, kterými je potažena pórovitá membrána. Látky přes tuto membránu prostupují z akceptorové části destičky do části donorové. V průběhu měření jejich koncentrace v akceptoru narůstá a v donoru klesá. Jelikož se jedná o fosfolipidovou membránu bez užší specifikace, bez přítomnosti transportérů, enzymů a dalších prvků vyskytujících se reálně v HEB, prostupují látky výhradně na základě svých fyzikálně-chemických vlastností. Koeficient P_e , který je výsledkem hodnocení prostupu PAMPA metodou, udává rychlost, kterou látka prostoupí skrz membránu. P_e je v literatuře udáváno pro sloučeniny, které prostupují do CNS v hodnotách $\geq 4,0 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$, pro látky neprostupující $\leq 2,0 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$ a u látek s hodnotou P_e mezi 2,0 a 4,0 nelze jejich prostup HEB na základě tohoto parametru spolehlivě predikovat (Di et al. 2003).

Z otestovaného setu 20 standardních klinicky užívaných léčiv bylo metodou PAMPA pět stanoveno odlišně vzhledem k jejich reálné *in vivo* CNS dostupnosti. Jedná se o látky, u kterých se na prostupu do mozku podílí aktivní transport či látky interagující s efluxními transportéry. Atenolol, v klinické praxi používaný jako selektivní betablokátor pro léčbu hypertenze, narozdíl od svého předchůdce propranololu neprostupuje *in vivo* do CNS. Atenolol byl stanoven metodou PAMPA na základě svého P_e jako CNS+. Dle podrobné studie distribuce atenololu v mozku bylo zjištěno, že na prostup atenololu pasivní difúzí má, v negativním slova smyslu, vliv efluxní transportér, který však nebyl doposud přesněji identifikován (Chen et al. 2017; 2020). Kofein, i jeho metabolity teofylin a teobromin jsou léčiva používaná k terapii respiračních onemocnění či jako stimulancia CNS. Jejich hodnoty koeficientů P_e však neřadí látky k CNS+, jak by se dalo předpokládat, s tím, že kofein má P_e spadající do neurčitého intervalu CNS+/-, teofylin a teobromin dokonce CNS-. Důvodem pro toto chybná určení je velmi pravděpodobně nepřítomnost aktivních transportérů v membráně

PAMPA, které se *in vivo* podílí na jejich prostupu do CNS. Dle literatury tato léčiva do mozku prostupují z části pasivní difúzí a z části aktivním přenašečovým systémem pro purinové alkaloidy (McCall et al. 1982). Kofein byl stanoven hraničně mezi CNS+ a CNS– pravděpodobně proto, že je nejvíce lipofilní ze všech tří léčiv, a tak prostupuje lipidovou membránou pasivní difúzí nejsnáze (Wilkinson a Pollard 1993). Antipyrin je léčivo užívané k léčbě bolesti, mechanismus účinku je založen na inhibici cyklooxygenázy 3 v CNS (Zarghi a Arfaei 2011). Pomocí PAMPA metody byl antipyrin vyhodnocen jako CNS-. Za toto nesprávné zařazení zřejmě opět zodpovídá podíl neznámého aktivního transportu na jeho prostupu přes HEB.

Obecně přes membránu PAMPA lipofilní látky prostupují snadno a rychle, látky nesoucí náboj neprostupují, nebo jen velmi omezeně a pomaleji. Tato hypotéza byla víceméně potvrzena korelací logD s koeficientem Pe, kdy byl korelační koeficient $r_s = 0,83$. Na korelační koeficient r_s mají vliv zejména falešně negativní a falešně pozitivní výsledky. Odlehlé hodnoty tvoří látky, jejichž logD neodpovídá předpokládanému prostupu přes membránu, tedy hodnotě Pe. Koeficient logD podává informaci o lipofilitě látky s ohledem na její ionizaci při pH = 7,4. Čím vyšší je hodnota logD, tím hůře se látka rozpouští ve vodném roztoku. LogD mezi 1 a 3 je optimální pro centrálně účinkující léčiva (Lindsley 2010). Látky s vyšší lipofilitou mají tendenci se akumulovat ve fosfolipidové membráně či obecně v tucích a disponují horší rozpustností ve vodných roztocích, což výrazně znesnadňuje jejich testování. Ukázalo se, že látky s logD nižším než 1 mají, až na některé výjimky, hodnotu koeficientu Pe odpovídající nízké predikci prostupu do CNS, tedy CNS-. Tyto výjimky jsou léčiva piroxikam, takrin a atenolol, které byly stanoveny jako CNS+, kofein jako CNS+/- (hodnoty logD 0,28–0,89). Ostatní látky, vyhodnocené PAMPA metodou jako CNS+, mají hodnoty logD vyšší než 1. odpovídají Negativní (CNS-) výsledky pro kofein, takrin, teofylin a antipyrin, získané PAMPA metodou, odpovídají spíše jejich logD než reálné *in vivo* dostupnosti v CNS. Tedy látky mají logD nízký, a proto lipofilní membránou pronikají hůře. V případě atenololu je situace jiná. LogD atenololu neodpovídá jeho dobrému prostupu lipidovou mebránou PAMPA metody. Se svým nízkým logD (-1,85) a Pe (5,6) odpovídajícím CNS+ negativně ovlivňuje vzájemnou korelaci obou parametrů. Toto stanovení je tedy pravděpodobně chybou metody a může být způsobeno interakcí léčiva s lipidem obsaženým v membráně ve smyslu usnadnění

prostupu. Tato interakce spočívající v tvorbě iontových párů s lipidy membrány byla popsána pro léčivo ze stejné skupiny, metoprolol (Teksin et al. 2006; 2010). Po odebrání atenololu z korelace se hodnota korelačního koeficientu zvýšila z 0,83 na 0,90. Jiné odlehlé body, které mohou snižovat korelační koeficient jsou pro látky, jejichž hodnoty $\log D$ a P_e nestoupají/neklesají stejnoměrně (např. obidoxim a cefuroxim s extrémně nízkými $\log D$), což je způsobeno zejména tím, že detekované množství v akceptorové části je velmi nízké. Protože se pohybuje v oblasti šumu, tedy v oblasti kolem limitu detekce či pod ním, je stanovené množství velmi nepřesné. Obráceně, nízký vstup vysoce lipofilního chlorpromazinu lze vysvětlit jeho možnou kumulací ve fosfolipidové membráně.

Fosfolipidová membrána PAMPA metody byla u dalšího modelu nahrazena monovrstvou buněk. Metoda využívající linii MDCK obohatila testování predikce prostupu látek přes HEB o další činitele, jako jsou různé transportéry a enzymy přítomné v živé buňce a také TJs (Tabulka 1) (Irvine et al. 1999; Quan et al. 2012). Výsledným parametrem popisujícím přestup látek přes buněčnou monovrstvu je koeficient Papp, který udává informaci o rychlosti prostupu látky přes tuto bariéru. Látky dobře prostupující monovrstvou MDCK vykazují vyšší nárůst koncentrace za testovaný čas, kdy v určitém bodě dojde ke zpomalení lineárního nárůstu až do vyrovnání koncentrací na obou stranách membrány. U látek prostupujících obtížně či neprostupujících je nárůst pomalejší a křivka nárůstu koncentrace v čase je za sledovanou dobu víceméně lineární. Zahrnutí buněčné kultury MDCK do modelu pro predikci prostupu látek přes HEB vedlo ke zvýšení validity tohoto testování. Z celkového setu 20 léčiv bylo 19 stanoveno ve shodě s jejich reálnou schopností prostupu do CNS *in vivo*. Vyjimku tvoří atenolol, na jehož nízkém prostupu přes HEB *in vivo* se podílí zmiňovaný efluxní mechanismus, který MDCK buněčná linie pravděpodobně neexprimuje, neboť jeho Papp (4,0) byl stanoven jako hraniční mezi léčivy klasifikovanými jako CNS+ a CNS- (Chen et al. 2017; 2020).

Korelace $\log D$ a MDCK metody ($r_s=0,72$) je nižší než korelace $\log D$ a PAMPA metody ($r_s=0,83$). Je to způsobeno tím, že látky s nízkým $\log D$ (<1), které využívají aktivní transport (antipyrin a xanthinové deriváty), jsou zde stanoveny jako CNS+, odlišně od PAMPA metody, ale správně s ohledem na reálnou *in vivo* CNS dostupnost.

Korelace PAMPA a MDCK metod byla sledována pomocí setu léčiv změřených oběma metodami. Vysoká hodnota korelačního koeficientu $r_s = 0,76$ ukazuje na fakt, že obě metody spolu korelují velmi dobře. Odlehlé hodnoty tvoří látky, které využívají aktivní transport (antipyrin, xanthinové deriváty) či interagují s efluxními mechanismy (atenolol) (McCall et al. 1982; Chen et al. 2017; 2020). PAMPA a MDCK metoda se liší v konečné klasifikaci látek právě ve čtyřech případech. Dalším vlivem ovlivňujícím korelaci je odlišný interval číselných hodnot, který je získán oběma metodami pro totožné látky prostupující CNS, kdy se naměřené hodnoty pro model s MDCK pohybují v rozpětí od 0,1 do 48, zatímco pro metodu PAMPA od 0,2 do 23.

Buněčná linie hCMEC/D3 byla zavedena pro testování jako vhodný model lidského původu. Tyto buňky byly odvozeny z buněk endotelu lidských mozkových kapilár. Jejich transportérová a enzymová výbava je ze všech tří modelů lidské HEB nejbližší (Poller et al. 2008; Weksler et al. 2013). Testováním setu standardních léčiv byla zjištěna 100% korelace s prostupem látek zjištěným *in vivo*. Predikce prostupu látek dle naměřených koeficientů Papp tedy odpovídala jejich klinicky zjištěné dostupnosti v CNS. Na rozdíl od předchozích modelů byl u buněčné linie hCMEC/D3 dle získaných dat atenolol vyhodnocen správně jako léčivo do CNS neprostupující. Buněčný model hCMEC/D3 se tak díky své podobnosti buňkám endotelu lidské HEB ukázal z hlediska správnosti predikce průchodu zvolených látek do CNS jako nejvěrohodnější. Na druhou stranu, buněčná monovrstva hCMEC/D3 netvoří tak pevná TJs jako monovrstva MDCK, což je zásadním nedostatkem u tohoto modelu. Měření TEER, které informuje o integritě vytvořené bariéry, ukázalo u modelu s MDCK přibližně $20 \times$ vyšší hodnoty než u modelu s D3. Tato skutečnost je velkým omezením buněčného modelu s D3, které je ovšem popisováno i v řadě publikací (Weksler et al. 2013; Daniels et al. 2013; Poller et al. 2008). Integrita bariéry a vytvoření TJs jsou totiž zásadní pro zabránění paracelulárnímu transportu látek přes monovrstvu. Použití modelu hCMEC/D3 pro hodnocení prostupu látek do CNS je z výše uvedených důvodů limitováno a je na zvážení, zda výhody, jako jsou transportérová a enzymová výbava a humánní původ linie převáží nad nedokonalou tvorbou monovrstvy. Možným řešením tohoto nedostatku by byla kokultivace buněk hCMEC/D3 s dalšími liniemi (např. astrocyty, neurony) a aplikace střihového napětí do modelu. Aplikace těchto vylepšení by mohla zvýšit hodnoty TEER tak, aby více odpovídaly hodnotám zjištěným pro HEB

u člověka (Nakagawa et al. 2007; Naik a Cucullo 2012). Takové uspořádání však vyžaduje vyšší technické nároky na úkor jednoduchosti modelu, určeného primárně pro screeningové účely. Buněčný model hCMEC/D3 by mohl být vhodný také pro studium jednotlivých transportérových systémů a intracelulární kumulace látek (Weksler et al. 2013).

Lze tedy shrnout, že všechny zavedené *in vitro* modely slouží k predikci potenciálu látek prostoupit přes HEB. PAMPA model je nejjednodušší na provedení, časově i finančně nejméně náročný. Jeho těžiště spočívá především v posouzení látky z hlediska lipofility, což je však pro predikci prostupu HEB nedostačující a lze ho z velké části nahradit predikcí pomocí výpočtu logD, jak prokázala vzájemná korelace. Avšak, v HEB je mnoho dalších činitelů, jež mají na transport látek vliv. Proto jsou buněčné modely obecně velkým krokem dopředu a přítomnost dějů typických pro živé buňky je důležitým faktorem ovlivňujícím výsledné stanovení prostupu. Testováním standardních látek jsme zjistili zásadní rozdíl mezi správností CNS+/- predikce PAMPA metodou a buněčným modelem MDCK. Při porovnání výsledků získaných metodou MDCK a buněčným modelem hCMEC/D3 došlo k dalšímu posunu ve správnosti predikce. Pro praktické využití je otázkou, zda je lidský původ hCMEC/D3 buněk důležitým benefitem i přes jejich sníženou schopnost vytvořit pevnou nepropustnou bariéru. Ačkoliv jde v případě MDCK modelu o buňky psích ledvin, jejichž transportérová, enzymová výbava i tvorba TJs je odlišná od lidské HEB (Wilhelm a Krizbai 2014), jeví se jako spolehlivější právě díky konzistentní tvorbě nepropustné bariéry. Buněčný model hCMEC/D3 má potenciál stát se dokonalejším modelem pro stanovení již vyselektovaných látek, je však zapotřebí zabránit jejich paracelulárnímu transportu a zlepšit jeho bariérové vlastnosti.

5.2 Možnosti zvýšení hladiny reaktivátorů acetylcholinesterázy v mozku

V rámci studia způsobů, jak zvýšit hladinu reaktivátorů AChE v mozku, byl nejprve studován přestup přes HEB u nově syntetizovaných monokvartérních a nekvartérních reaktivátorů AChE, aplikována nová metoda pro hodnocení interakce látek s Pgp, a dále byl v rámci spolupráce testován přestup reaktivátorů přes bariéru pomocí nanočástic a za pomoci CB[7].

Zvýšení dostupnosti reaktivátorů AChE v CNS je dlouhodobým cílem řady výzkumných laboratoří po celém světě. Způsobů, jak zvýšit koncentraci reaktivátoru v tomto důležitém cílovém místě, jakým je mozek, bylo vyzkoušeno již několik. Některé z nich se neosvědčily, jiné vyžadují další výzkum a optimalizaci před zavedením do klinické praxe. Mezi publikovanými, z pohledu dosažených výsledků méně úspěšnými přístupy, je možné zmínit syntézu proléčiv či konjugaci reaktivátorů s cukernou složkou (Rachaman et al. 1979; Heldman et al. 1986; Garcia et al. 2010). Naopak velký potenciál z hlediska zvýšení hladiny léčiva v CNS má využití intranasálního podání (Krishnan et al. 2016). Avšak, aplikace a následná kontrola hladiny podaného léčiva je v tomto případě poměrně komplikovaná (Gänger a Schindowski 2018). Pro skupinu reaktivátorů, jakožto antidot otrav OFI, kdy je nutné často terapeuticky zasáhnout v náročných bojových podmínkách, je toto podání technicky těžko realizovatelné. Syntéza nových, ať už monokvartérních či nenabitých reaktivátorů je jinou možnou cestou k výše uvedenému cíli. Zejména, nekvartérní reaktivátory se jeví z hlediska prostupu do CNS jako velmi nadějně (Mercey et al. 2011). Monokvartérní (a biskvartérní) reaktivátory mají v porovnání s nekvartérními obecně lepší farmakologické vlastnosti, zejména pak reaktivační účinnost, avšak lze předpokládat, že na úkor dostupnosti v CNS. Pro účely testování prostupu nově syntetizovaných reaktivátorů do mozku bylo v této práci využito zavedených *in vitro* modelů, a následně i *in vivo* experimentů. Co se týká syntézy nových reaktivátorů s vlastnostmi, které vedou k vyšší účinnosti v CNS, stojí za zmínku tzv. dipolární (zwitterionické) analogy, které ve své nenabité formě prostoupí přes HEB a jejich nabitá forma následně zajistí účinnou reaktivaci (Rosenberg et al. 2017; Radić et al. 2012; Kovarik et al. 2013). Dalším studovaným způsobem, jak zvýšit dostupnost standardních reaktivátorů v CNS a zlepšit terapii otrav OFI je inhibice Pgp. Důkaz přímé interakce reaktivátorů s Pgp, který v odborné literatuře nebyl doposud dostatečně popsán, ale pouze předpokládán, byl dalším z cílů této práce (Joosen et al. 2011; 2016). V poslední řadě, využití nosičových nanočástic je slibným přístupem intenzivně studovaným i v jiných oblastech medicíny (např. protinádorová léčba) (Brigger et al. 2002). Nanočástice jsou schopné vázat léčivo, zlepšovat jeho farmakologické vlastnosti a potenciálně i prostup do CNS. V rámci spolupráce byly v této dizertační práci testovány dva druhy nanočástic, diamantové nanočástice nesoucí oximovou skupinu

a CB[7] nanočástice s navázaným reaktivátorem, pomocí buněčných modelů a také *in vivo* na myším modelu.

5.2.1 Testování standardních a nově syntetizovaných reaktivátorů acetylcholinesterázy

Metodou PAMPA a MDCK byly testovány standardní reaktivátory (pralidoxim, obidoxim, trimedoxim, methoxim a HI-6). Výsledné koeficienty P_e i P_{app} menší než 1 klasifikují všechny testované reaktivátory do CNS- látek, což odpovídá i jejich nízké dostupnosti v CNS *in vivo*, která je dána přítomností permanentního náboje kvartérního dusíku v molekule (Lorke et al. 2008; Žďárová Karasová et al. 2014).

Následně byly testovány také nově připravené reaktivátory AChE. Jedním z cílů syntézy nových reaktivátorů AChE pro léčbu otrav OFI je jejich vysoká reaktivační účinnost vůči inhibované AChE v mozku. Zvyšováním lipofility reaktivátorů se zvyšuje i jejich potenciál prostupu přes HEB. Série monokvartérních a nekquartérních reaktivátorů tak byly testovány metodou PAMPA a MDCK. Výsledky pro reaktivátory obsahující ve své struktuře jeden nabitý dusík byly z hlediska prostupnosti do CNS negativní. Všech 5 nekquartérních reaktivátorů (K1371, K1373, K1374, K1375 a K1385) bylo otestováno metodou PAMPA. Jejich koeficienty P_e nepřesáhly hodnotu 0,5, což predikuje špatnou prostupnost do CNS. Dva z nich byly pro ověření testovány také MDCK buněčným modelem, kdy se téměř nulové hodnoty shodovaly s výsledky z metody PAMPA, a proto nebylo v měření série dále pokračováno. Pro finální ověření našich výsledků byly tři monokvartérní reaktivátory s nejlepšími farmakologickými vlastnostmi (zejména reaktivační účinnost) hodnoceny také *in vivo* na myších. Nicméně, dostupnost těchto reaktivátorů v mozku po podání 5 % LD_{50} nebyla vyšší než 1 % plazmatické koncentrace, což odpovídá bispyridiniovým reaktivátorům používaným v klinické praxi (Bajgar 2004). Monokvartérní reaktivátory se tedy dle výsledků *in vivo* experimentů z hlediska prostupnosti do CNS neosvědčily. Nízká šance na prostup přes HEB u kvartérních reaktivátorů (a obecně nabitých sloučenin) je totiž dána přítomností náboje v jejich struktuře a počet nábojů v molekule již nehraje významnou roli. Snaha snížit počet kvartérních dusíků tak, aby byla zachována dostatečná reaktivační účinnost u monokvartérních reaktivátorů, nebyla tedy z hlediska zvýšení jejich dostupnosti v CNS příliš úspěšná.

V případě nenabitých nově syntetizovaných reaktivátorů AChE byly jako CNS+ stanoveny tři ze čtyř testovaných látek (K1278, K1279, K1281), a to jak metodou PAMPA, tak i metodou MDCK. Reaktivátor K1280 je amfolytická sloučenina, která při pH organismu ve vodném prostředí tvoří zwitterion, obsahuje pak tedy pozitivní i negativní náboj ve své molekule. Díky své struktuře vykazuje lepší reaktivační účinnost v porovnání s nenabitými reaktivátory (Radić et al. 2012; Sit et al. 2011). Jeho celkový neutrální náboj mu umožňuje procházet lipidovou membránou lépe než nabitým sloučeninám, avšak ne lépe než těm nenabitým, jak ukázaly výsledky testování. Metodou PAMPA byl zařazen mezi sloučeniny s neurčitou dostupností v CNS a metodou MDCK byl stanoven dokonce jako CNS-. Látky z této série, u kterých bylo odebráním náboje dosaženo zvýšené dostupnosti v CNS, vypadají v tomto směru nadějně. Jejich terapeutická účinnost *in vivo* však závisí mimo schopnosti průchodu do CNS i na jejich reaktivačním potenciálu a jejich fyzikálně–chemických vlastnostech. Toto bývá v případě nekvartérních reaktivátorů problematické, neboť nepřítomnost permanentního náboje snižuje reaktivační účinnost a jejich lipofilita vede ke zvýšenému akumulárnímu potenciálu (riziko toxicity), špatné rozpustnosti ve vodném prostředí a *off-target* účinkům. Zejména špatná rozpustnost potom vede ke ztížené aplikaci a pomalejšímu nástupu účinku, což je z pohledu zařazení mezi antidota nevhodné (Soukup et al. 2018).

5.2.2 Posouzení interakce standardních reaktivátorů acetylcholinesterázy s P-glykoproteinem

Dalším cílem práce bylo zavést model pro studium interakce látek s Pgp a zjistit, zda se Pgp nepodílí na nízkém prostupu standardních reaktivátorů do CNS. Jelikož až 60 % léčiv uvedených do praxe interaguje s Pgp, je zde možnost, že oximové reaktivátory budou patřit mezi ně (Hersh et al. 2016). Bylo také publikováno několik studií zabývajících se vlivem Pgp na účinnost reaktivátorů (Gallagher et al. 2016; Joosen et al. 2011; 2016). Konkrétně, inhibicí tohoto efluxního transportéru tariquidarem bylo dosaženo lepšího terapeutického účinku u reaktivátoru HI-6 podaného s atropinem u potkanů (Joosen et al. 2011; 2016). Nebyly však studovány všechny standardní reaktivátory, což by umožnilo potvrdit či vyvrátit tento jev pro tuto skupinu látek, ani nebyla potvrzena přímá interakce oximu s Pgp. Tento přímý průkaz byl cílem našeho testování.

CACO-2 buněčná linie stabilně exprimuje Pgp, který je zodpovědný za eflux mnoha látek z HEB zpět do krevního oběhu. Tento model byl zaveden na našem pracovišti jako vhodný způsob pro studium interakce látek s Pgp (Natoli et al. 2012). Pokud látka interaguje s Pgp transportérem, který je umístěn na apikální straně membrány, je její vstup ve směru AB i BA je asymetrický. Tato asymetrie vyjádřená TR je pro substráty Pgp ≥ 2 . Následné zablokování Pgp specifickým inhibitorem vede ke snížení tohoto rozdílu, a tím i k redukci TR (Polli et al. 2001; Zhang et al. 2006). Metoda byla validována pomocí specifického substrátu R123 a inhibitoru Pgp verapamilu. Hodnota TR pro R123 byla po přidání inhibitoru snížena ze 4,5 na 1,3.

Experimentálně bylo prokázáno, že hodnoty TR pro studované standardní reaktivátory nepřesáhly hranici 2, odpovídající potenciálním substrátům Pgp. Kontrolní experiment, spočívající v ko-aplikaci inhibitoru Pgp, nijak výrazně nezměnil tyto hodnoty. Celkově velmi nízká koncentrace reaktivátorů (hodnoty jejich koeficientů Papp blízké nule), která projde přes membránu CACO-2 modelu, a tedy i následně do mozku v *in vivo* situaci, je způsobena spíše než efluxním transportem především jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi, kdy nabitý kvartérní dusík brání prostupu přes buněčnou membránu i lipofilní HEB. Tedy, i v hypotetickém v případě, že by reaktivátory interagovaly s Pgp zůstává otázkou, na kolik by jeho inhibice vstup takto nabitých látek zvýšila. Hypotéza, kdy inhibitor Pgp přímo zvýší vstup samotného oximového reaktivátoru do mozku tedy potvrzena modelem CACO-2 v našich experimentech nebyla (Kobrova a Soukup 2020). Ovlivnění Pgp u dalších antidot (např. atropin) či jejich kombinací používaných v terapii otrav OFI, však stále zůstává možným přístupem, který by mohl vést ke zlepšení jejich celkové terapeutické účinnosti (Meerhoff et al. 2018).

5.3 Diamantové nanočástice jako nosiče zlepšující penetraci navázaných reaktivátorů acetylcholinesterázy do mozku

ND částice s navázanou oximovou skupinou, které byly syntetizovány prof. Karpichevem, byly v rámci spolupráce testovány z hlediska vstupu přes MDCK buněčnou bariéru simulující HEB. Základní hypotéza přípravy ND s oximovou skupinou byla skutečnost, že jsou ND s navázaným léčivem zkoumány v terapii nádorových onemocnění, kdy vazba ND na cytostatikum zlepšuje jeho vstup

přes endoteliální buňky (Setyawati et al. 2016). Mechanismus prostupu ND dle literatury spočívá pravděpodobně v narušení TJs změnou infrastruktury buněk, způsobené uvolňováním radikálů jako produktů vyvolaného oxidačního stresu a dále zvýšením intracelulárního Ca^{2+} (Setyawati et al. 2016).

K testování byla vybrána látka De-3, která byla měřena ve dvou koncentracích ($10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ a $100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) z hlediska prostupu a později i intracelulární akumulace v buňkách membrány. Papp koeficienty testovaných koncentrací svými hodnotami 15 ($10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) a 4,7 ($100 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$) řadí látku mezi sloučeniny s potenciálem prostoupit do CNS, zejména v nižší testované koncentraci. Lepší prostupnost v nižší koncentraci vedla k hypotéze, že se ND ve vyšší koncentraci mohou, po předchozí disagregaci ultrazvukem, opětovně agregovat a akumulovat se uvnitř buněk. Stanovení jejich intracelulární koncentrace ukázalo, že při koncentraci $10 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ je 13 % celkového množství akumulováno uvnitř buněčné monovrstvy, pro vyšší koncentraci až 30 %. Pro ověření cytotoxicity ND byly obě koncentrace testovány MTT testem, který je vyhodnotil pro buněčnou linii MDCK jako netoxické. Prostup přes monovrstvu by totiž v případě HEB neměl být ovlivněn toxickým působením ND a následnou dezintegrací monovrstvy v jeho důsledku. Hodnoty průchodu FITC-dextranu se pohybovaly do 2 % na konci experimentu, což značí poměrně malé narušení integrity buněčné monovrstvy způsobené přítomností ND částic. Na druhou stranu, v porovnání s téměř nulovými hodnotami FITC-dextranu pro testované standardní látky může však toto narušení integrity způsobit zvýšený vstup ND částic přes buněčnou monovrstvu.

Z hlediska překonání HEB by tedy tyto částice mohly vést ke zlepšení dostupnosti navázaných látek. Reaktivací účinnost oximu navázaného na ND u látky De-3 byla nižší než 1 %, nemělo tedy smysl studovat její reaktivací účinnost po průchodu monovrstvou. Látku s takto nízkou reaktivací účinností nelze využít pro terapeutické účely, a proto má provedený experiment význam spíše pro ověření konceptu možnosti vazby látek na ND, než z hlediska ověření potenciálního léčiva otrav OFI.

5.4 Využití cucurbit[7]urilových nanočástic pro zlepšení penetrace HI-6 do mozku

CB[7] jsou makrocyclické molekuly, které vznikají kondenzací glykourilu a formaldehydu (Lagona et al. 2005; Liu et al. 2005). Jsou dobře rozpustné ve vodě

a vážou mnoho klinicky běžně užívaných léčiv (Wheate et al. 2006; Wyman a Macartney 2009). Tyto nanočástice jsou schopné vázat pozitivně nabitě sloučeniny a tvořit s nimi komplexy (Andrýs et al. 2020). Předpokladem pro zlepšení penetrace reaktivátorů do mozku je jejich enkapsulace do kavity CB[7], která by mohla vést k optimalizaci farmakokinetických parametrů, zejména prodloužení eliminačního poločasu včetně zvýšení dostupnosti v CNS. CB[7] zvyšují rozpustnost a stabilitu enkapsulovaných sloučenin a mají schopnost prostoupit biologické membrány (Montes-Navajas et al. 2009; Wang et al. 2020). Zajímavostí je, že samotné částice CB[7] však přes HEB neprocházejí (Gale a Steed 2012). Farmakokinetika reaktivátoru HI-6, navázaného na molekulu CB[7], byla studována *in vivo* v rámci spolupráce se skupinou doc. Jany Žďárové Karasové. V rámci provedené studie byla hodnocena prostupnost komplexu CB[7] s navázaným reaktivátorem HI-6 do mozku *in vivo* v myším modelu a její porovnání s volnou, tedy nevázanou látkou. Vazba na částice CB[7] ovlivnila farmakokinetiku HI-6 v mozku myši v pozitivním slova smyslu. C_{max} reaktivátoru v mozku byla sice nižší a prostup pomalejší, nicméně poločas eliminace byl výrazně prodloužen v porovnání s nevázanou látkou HI-6, což vedlo k výrazně lepší celkové dostupnosti HI-6 v CNS. Mechanismus, kterým se hladina HI-6 po vazbě na CB[7] udrží v mozku déle, však nebyl zatím zcela objasněn. V úvahu zde připadá pozorovaný prodloužený poločas eliminace také v plasmě, který zpomaluje eliminaci z CNS na základě koncentračního gradientu.

Komplex HI-6@CB[7] také prokázal o 10 % vyšší reaktivaci mozkové AChE po intoxikaci myši somanem v porovnání se samotnou HI-6. Mimo to, CB[7] také prokázaly pozitivní vliv na hladinu atropinu v mozku (Karasova et al. 2020). Částice tohoto typu jsou v tomto směru poměrně nadějnou cestou, ačkoliv je nutné se vypořádat s možnými nežádoucími účinky, jako je jejich nefrotoxicita (Gale a Steed 2012).

6. Závěr

Pro potenciální léčiva, která mají za cíl interagovat se strukturami v mozku je zásadní vlastností překonat HEB. Je zřejmé, že *in vitro* metody pro predikci této vlastnosti nových chemických entit nemohou zcela nahradit testování *in vivo*. Umožňují však primární *screening*, který vede k selekci látek a tím k redukci počtu laboratorních zvířat. Vývoj nových *in vitro* metod, využívajících buněčné kultury, je vhodnou spojkou mezi *in silico* predikcí a *in vivo* testováním. Porovnáním nebuněčných (PAMPA metoda) a buněčných modelů byl zjištěn významný posun z hlediska správnosti určení látek s ohledem na jejich *in vivo* klinickou CNS dostupnost. Mezi zkoumanými buněčnými liniemi vyniká MDCK svou integritou a hCMEC/D3 linie svým humánním původem.

Námi zjištěné výsledky testování různých způsobů, jak zvýšit hladinu reaktivátorů AChE v CNS na konkrétních nových sloučeninách jsou víceméně v souladu s doposud získanými daty napříč odbornou literaturou. Testování lipofilních analogů oximových reaktivátorů bylo z hlediska prostupnosti do CNS úspěšné. Jejich nevýhodné fyzikálně-chemické, a z nich vyplývající i farmakologické vlastnosti, jsou však zásadním nedostatkem těchto látek. Při inhibici Pgp nebyl prokázán přímý vliv na dostupnost standardních reaktivátorů v CNS. Nicméně vliv Pgp na další antidota, jako je atropin, zůstává zajímavým tématem k dalšímu zkoumání. Směr využívající nanočástice lze považovat za nadějný, pokud by se podařilo vyvážit jejich přínos vs. nežádoucí účinky jako je např. toxicita, akumulace v organismu a v neposlední řadě jejich finanční náročnost.

Nalezení centrálně aktivního a širokospektrého reaktivátoru považujeme nadále za zásadní cíl v oblasti terapie otrav OFI. Jsou zde však i další směry výzkumu zabývající se způsoby ochrany CNS zasaženého OFI, kde nalezení centrálně aktivních reaktivátorů není esenciální podmínkou. Mezi ně lze zařadit farmaceutický přístup v podobě intranasálního podání léčiv, které cílí na přímý prostup antidot do CNS. Dalším je farmakologický přístup, využívající kombinace léčiv z různých terapeutických skupin, kdy by relativně malá dávka reaktivátoru prostupujícího do CNS mohla při podání s dalšími antidoty účinkovat dostatečně z pohledu ochrany CNS při otravě. Kombinace parasymptolytik, léčiv s antiglutamatergními a GABAergními

účinky s reaktivátory je alternativní cestou, která by mohla redukovat poškození mozku. Využití profylaktik i pro post-expoziční terapii otrav OFI je nadějný způsob, jak zvýšit účinnost standardních antidot (Mann et al. 2018). V neposlední řadě, tím, že se jedná o antidota zachraňující život, lze předpokládat, že riziko nežádoucích účinků pramenící z vyšší, než standardní aplikované dávky je nižší než riziko závažných trvalých postižení CNS či úmrtí. Z tohoto pohledu lze uvažovat o podávání vyšších dávek, kdy frakce prostupující do CNS ji může lépe ochránit než při podání standardní dávky.

7. Přínos práce

Hlavním přínosem této dizertační práce je zavedení, optimalizace, validace a porovnání *in vitro* metod pro predikci schopnosti látek prostoupit přes HEB. Nově zavedené metody využívající buněčné kultury vycházejí z metody PAMPA, která již byla na pracovišti k predikci využívána. Obohacení způsobů studia prostupu látek přes membránu na základě fyzikálně-chemických vlastností spočívá v přítomnosti živých organismů v podobě buněčných kultur. Membrány tvořené buněčnou monovrstvou se svými charakteristickými vlastnostmi (aktivní a efluxní transport, metabolické děje) posouvají toto *in vitro* testování blíže k charakteristikám HEB *in vivo*. Zavedením nových metod využívajících buněčné linie MDCK, hCMEC/D3 a CACO-2 byl vytvořen komplexnější nástroj pro testování nově syntetizovaných potenciálních antidot pro léčbu otrav NPL, který navazuje na metodu PAMPA a vytváří další filtr před testováním látek *in vivo*. Využitím predikce využívající vlastností buněčných membrán může být docíleno stavu, kdy pomocí experimentálních zvířecích modelů budou testovány jen vyselektované látky s nejlepšími vlastnostmi, čímž bude redukována jejich spotřeba v souladu s etickými požadavky zakotvenými v národní i mezinárodní legislativě. Využití nových *in vitro* metod s sebou nese i nezanedbatelné finanční úspory v porovnání s realizací odpovídajících *in vivo* experimentů. Hledání nových univerzálních reaktivátorů s dostatečnou účinností v CNS je stále aktuálním tématem, kterým se KTVF FVZ UO zabývá a které je nezbytné je řešit pro úspěšnou léčbu otrav NPL. Z tohoto důvodu je poznání způsobů a mechanismů, vedoucích ke zlepšení dostupnosti reaktivátorů AChE v CNS, dalším významným přínosem této dizertační práce.

8. Seznam použité literatury

ABBOTT, N. Joan, Lars RÖNNBÄCK a Elisabeth HANSSON, 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience* [online]. **7**(1), 41–53. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/nrn1824

ABOU-DONIA, M. B., 1981. Organophosphorus Ester-Induced Delayed Neurotoxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. **21**(1), 511–548. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.pa.21.040181.002455

AIGNER, T. G., 1995. Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Current Opinion in Neurobiology* [online]. **5**(2), 155–160. ISSN 0959-4388. Dostupné z: doi:10.1016/0959-4388(95)80021-2

ALAVIJEH, Mohammad S., Mansoor CHISHTY, M. Zeeshan QAISER a Alan M. PALMER, 2005. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* [online]. **2**(4), 554–571. ISSN 1545-5343. Dostupné z: doi:10.1602/neurorx.2.4.554

ANDRÝS, Rudolf, Aneta KLUSOŇOVÁ, Miroslav LÍSA a Jana Žd'árová KARASOVÁ, 2020. Encapsulation of oxime acetylcholinesterase reactivators: influence of physiological conditions on the stability of oxime-cucurbit[7]uril complexes. *New Journal of Chemistry* [online]. **44**(34), 14367–14372. ISSN 1369-9261. Dostupné z: doi:10.1039/D0NJ03102J

ANTONIJCIC, B., D. STEFANOVIĆ, Z. A. MILOVANOVIC, M. P. STOJILJKOVIC, D. BOKONJIC a M. DUKIC, 2002. Standard antidotes along with sodium bicarbonate in organophosphate poisoning. In: *Proceedings of chemical and biological medical treatment symposium (CBMTS); Spiez, Switzerland*.

ARNOTT, John A a Sonia Lobo PLANEY, 2012. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. **7**(10), 863–875. ISSN 1746-0441, 1746-045X. Dostupné z: doi:10.1517/17460441.2012.714363

ASKEW, Beryl M., 1956. Oximes and hydroxamic acids as antidotes in anticholinesterase poisoning. *British Journal of Pharmacology*. **11**(4), 417–423.

BAGCHI, Sounak, Tanya CHHIBBER, Behnaz LAHOOTI, Angela VERMA, Vivek BORSE a Rahul Dev JAYANT, 2019. In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies: an overview. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. **13**, 3591–3605. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S218708

BAJGAR, Jirí, 2004. Organophosphates / Nerve Agent Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis, And Treatment. In: *Advances in Clinical Chemistry* [online]. B.m.: Elsevier, s. 151–216 [vid. 2018-03-12]. ISBN 978-0-12-010338-6. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2423(04)38006-6

BIEMANS, Elisanne A. L. M., Lieke JÄKEL, Robert M. W. de WAAL, H. Bea KUIPERIJ a Marcel M. VERBEEK, 2017. Limitations of the hCMEC/D3 cell line as a model for A β clearance by the human blood-brain barrier. *Journal of Neuroscience Research* [online]. **95**(7), 1513–1522. ISSN 1097-4547. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/jnr.23964

BOOTH, Ross a Hanseup KIM, 2012. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB). *Lab on a Chip* [online]. **12**(10), 1784–1792. ISSN 1473-0189. Dostupné z: doi:10.1039/c2lc40094d

BRIGGER, Irène, Catherine DUBERNET a Patrick COUVREUR, 2002. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. **54**(5), 631–651. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-409X(02)00044-3

BUSSOLARI, S. R., C. F. DEWEY a M. A. GIMBRONE, 1982. Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. *The Review of Scientific Instruments* [online]. **53**(12), 1851–1854. ISSN 0034-6748. Dostupné z: doi:10.1063/1.1136909

BUTT, A. M., H. C. JONES a N. J. ABBOTT, 1990. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *The Journal of Physiology* [online]. **429**, 47–62. ISSN 0022-3751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.1990.sp018243

CALAS, André-Guilhem, José DIAS, Catherine ROUSSEAU, Mélanie ARBOLÉAS, Mélanie TOUVREY-LOIODICE, Guillaume MERCEY, Ludovic JEAN, Pierre-Yves RENARD a Florian NACHON, 2017. An easy method for the determination of active concentrations of cholinesterase reactivators in blood samples: application to the efficacy assessment of non quaternary reactivators compared to HI-6 and pralidoxime in VX-poisoned mice. *Chemico-biological interactions*. **267**, 11–16.

CORNFORD, Eain M. a Shigeyo HYMAN, 2005. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx*. **2**(1), 27–43.

CRIVORI, Patrizia, Gabriele CRUCIANI, Pierre-Alain CARRUPT a Bernard TESTA, 2000. Predicting Blood–Brain Barrier Permeation from Three-Dimensional Molecular Structure. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **43**(11), 2204–2216. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm990968+

DADPARVAR, Miriam, Sylvia WAGNER, Sascha WIEN, Jürgen KUFLEITNER, Franz WOREK, Hagen VON BRIESEN a Jörg KREUTER, 2011. HI 6 human serum albumin nanoparticles—Development and transport over an in vitro blood–brain barrier model. *Toxicology letters*. **206**(1), 60–66.

DADPARVAR, Miriam, Sylvia WAGNER, Sascha WIEN, Franz WOREK, Hagen VON BRIESEN a Jörg KREUTER, 2014. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **88**(2), 510–517.

DANIELS, Brian P., Lillian CRUZ-ORENGO, Tracy Jo PASIEKA, Pierre-Olivier COURAUD, Ignacio A. ROMERO, Babette WEKSLER, John A. COOPER, Tamara L. DOERING a Robyn S. KLEIN, 2013. Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells maintain the properties of primary cells in an in vitro model of immune migration across the blood brain barrier. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. **212**(1), 173–179. ISSN 1872-678X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jneumeth.2012.10.001

DASH, Alekha K a William F ELMQUIST, 2003. Separation methods that are capable of revealing blood–brain barrier permeability. *Journal of Chromatography B* [online]. **797**(1), Interactions in Biological Systems, 241–254. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/S1570-0232(03)00605-6

DEMAR, James C., Edward D. CLARKSON, Ruthie H. RATCLIFFE, Amy J. CAMPBELL, Sonia G. THANGAVELU, Christine A. HERDMAN, Haim LEADER, Susan M. SCHULZ, Elizabeth MAREK a Marie A. MEDYNETS, 2010. Pro-2-PAM therapy for central and peripheral cholinesterases. *Chemico-biological interactions*. **187**(1–3), 191–198.

DEMEULE, Michel, Anthony RÉGINA, Julie JODOIN, Alain LAPLANTE, Claude DAGENAIS, France BERTHELET, Albert MOGHRABI a Richard BÉLIVEAU, 2002. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascular Pharmacology* [online]. **38**(6), 339–348. ISSN 1537-1891. Dostupné z: doi:10.1016/s1537-1891(02)00201-x

DHURIA, Shyeilla V., Leah R. HANSON a William H. FREY, 2010. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **99**(4), 1654–1673. ISSN 1520-6017. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21924

DI, Li, Edward H. KERNS, Kristi FAN, Oliver J. MCCONNELL a Guy T. CARTER, 2003. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **38**(3), 223–232. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/s0223-5234(03)00012-6

DUKES, Joseph D, Paul WHITLEY a Andrew D CHALMERS, 2011. The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biology* [online]. **12**, 43. ISSN 1471-2121. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2121-12-43

EDDLESTON, Michael, Nick A BUCKLEY, Peter EYER a Andrew H DAWSON, 2008. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *The Lancet* [online]. **371**(9612), 597–607. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(07)61202-1

ETEMAD, Leila, Mohammad MOSHIRI a Seyed Adel MOALLEM, 2014. Chronic Toxicity of Organophosphorus Compounds. In: Mahdi BALALI-MOOD a Mohammad ABDOLLAHI, ed. *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds* [online]. London: Springer, s. 79–118 [vid. 2020-08-26]. ISBN 978-1-4471-5625-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4471-5625-3_4

GALE, Philip A. a Jonathan W. STEED, ed., 2012. *Supramolecular chemistry: from molecules to nanomaterials*. Chichester: Wiley. ISBN 978-0-470-74640-0.

GALLAGHER, Erin, Il MINN, Janice E. CHAMBERS a Peter C. SEARSON, 2016. In vitro characterization of pralidoxime transport and acetylcholinesterase reactivation across MDCK cells and stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells (BC1-hBMECs). *Fluids and barriers of the CNS* [online]. **13**(1), 10. ISSN 2045-8118. Dostupné z: doi:10.1186/s12987-016-0035-0

GÄNGER, Stella a Katharina SCHINDOWSKI, 2018. Tailoring Formulations for Intranasal Nose-to-Brain Delivery: A Review on Architecture, Physico-Chemical Characteristics and Mucociliary Clearance of the Nasal Olfactory Mucosa. *Pharmaceutics* [online]. **10**(3) [vid. 2019-04-16]. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics10030116

GARBERG, P., M. BALL, N. BORG, R. CECHELLI, L. FENART, R. D. HURST, T. LINDMARK, A. MABONDZO, J. E. NILSSON, T. J. RAUB, D. STANIMIROVIC, T. TERASAKI, J.-O. OBERG a T. OSTERBERG, 2005. In vitro models for the blood-brain

barrier. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* [online]. **19**(3), 299–334. ISSN 0887-2333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2004.06.011

GARCIA, Gregory E., Amy J. CAMPBELL, John OLSON, Deborah MOORAD-DOCTOR a Venee I. MORTHOLE, 2010. Novel oximes as blood–brain barrier penetrating cholinesterase reactivators. *Chemico-biological interactions*. **187**(1–3), 199–206.

GHOSH, R. a J. F. NEWMAN, 1955. A new group of organophosphorus pesticides. *Chemistry & Industry*. (5), 118–118.

GORDON, Richard K., Amy J. CAMPBELL, Madhusoodana P. NAMBIAR, Roberta R. OWENS, Ruthie H. RATCHIFFE, James C. DEMAR, Angela R. DAVIS, Latoya A. HYSOON, Farhat A. KHAN a Elizabeth MAREK, 2008. *PRO-2-PAM: The First Therapeutic Drug for Reactivation of Organo-Phosphate-Inhibited Central (Brain) and Peripheral Cholinesterases*. B.m.: WALTER REED ARMY INST OF RESEARCH SILVER SPRING MD.

GORECKI, Lukas, Jan KORABECNY, Kamil MUSILEK, David MALINAK, Eugenie NEPOVIMOVA, Rafael DOLEZAL, Daniel JUN, Ondrej SOUKUP a Kamil KUČA, 2016. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Archives of Toxicology* [online]. **90**(12), 2831–2859. ISSN 1432-0738. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-016-1827-3

GORECKI, Lukas, Jan KORABECNY, Kamil MUSILEK, Eugenie NEPOVIMOVA, David MALINAK, Tomas KUCERA, Rafael DOLEZAL, Daniel JUN, Ondrej SOUKUP a Kamil KUČA, 2017. Progress in acetylcholinesterase reactivators and in the treatment of organophosphorus intoxication: a patent review (2006–2016). *Expert opinion on therapeutic patents*. **27**(9), 971–985.

HANSON, Leah R a William H FREY, 2008. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neuroscience* [online]. **9**(Suppl 3), S5. ISSN 1471-2202. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2202-9-S3-S5

HAYES, Maria, Lars Fredrik MOEN, Mark A. E. AUTY a Tor Erling LEA, 2016. Transport of a Prolyl Endopeptidase Inhibitory Peptide across the Blood-Brain Barrier Demonstrated Using the hCMEC/D3 Cell Line Transcytosis Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. **64**(1), 146–150. ISSN 1520-5118. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jafc.5b04696

HE, Fengsheng, Haibing XU, Fukuang QIN, Li XU, Jinxiang HUANG a Xiwen HE, 1998. Intermediate myasthenia syndrome following acute organophosphates poisoning-an analysis of 21 cases. *Human & Experimental Toxicology* [online]. **17**(1), 40–45. ISSN 0960-3271, 1477-0903. Dostupné z: doi:10.1177/096032719801700107

HE, Yarong, Yao YAO, Stella E. TSIRKA a Yu CAO, 2014. Cell-culture models of the blood-brain barrier. *Stroke* [online]. **45**(8), 2514–2526. ISSN 1524-4628. Dostupné z: doi:10.1161/STROKEAHA.114.005427

HELDMAN, Eli, Yacov ASHANI, Lily RAVEH a Eliezer S. RACHAMAN, 1986. Sugar conjugates of pyridinium aldoximes as antidotes against organophosphate poisoning. *Carbohydrate Research* [online]. **151**, 337–347. ISSN 0008-6215. Dostupné z: doi:10.1016/S0008-6215(00)90353-7

HELLINGER, Eva, Szilvia VESZELKA, Andrea E. TÓTH, Fruzsina WALTER, Agnes KITTEL, Mónika Laura BAKK, Károly TIHANYI, Viktor HÁDA, Shinsuke NAKAGAWA,

Thuy Dinh Ha DUY, Masami NIWA, Mária A. DELI a Monika VASTAG, 2012. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* [online]. **82**(2), 340–351. ISSN 1873-3441. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2012.07.020

HELMS, Hans C, N Joan ABBOTT, Malgorzata BUREK, Romeo CECHELLI, Pierre-Olivier COURAUD, Maria A DELI, Carola FÖRSTER, Hans J GALLA, Ignacio A ROMERO, Eric V SHUSTA, Matthew J STEBBINS, Elodie VANDENHAUTE, Babette WEKSLER a Birger BRODIN, 2016. In vitro models of the blood–brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [online]. **36**(5), 862–890. ISSN 0271-678X. Dostupné z: doi:10.1177/0271678X16630991

HEPNAROVA, Vendula, Lubica MUCKOVA, Avi RING, Jaroslav PEJCHAL, David HERMAN, Jan MISIK, Martina HRABINOVA, Daniel JUN a Ondrej SOUKUP, 2019. Pharmacological and toxicological in vitro and in vivo effect of higher doses of oxime reactivators. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **383**, 114776. ISSN 0041-008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2019.114776

HERSH, David S., Aniket S. WADAJKAR, Nathan ROBERTS, Jimena G. PEREZ, Nina P. CONNOLLY, Victor FRENKEL, Jeffrey A. WINKLES, Graeme F. WOODWORTH a Anthony J. KIM, 2016. Evolving Drug Delivery Strategies to Overcome the Blood Brain Barrier. *Current pharmaceutical design*. **22**(9), 1177–1193. ISSN 1381-6128.

HOLMSTEDT, Bo, 1963. Structure-Activity Relationships of the Organophosphorus Anticholinesterase Agents. In: George B. KOELLE, ed. *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 428–485 [vid. 2018-03-12]. ISBN 978-3-642-99877-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-99875-1_9

HOOG, Günter a Angela STEINMETZ, ed., 1993. 9. Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction. In: Günter HOOG a Angela STEINMETZ, ed. *International Conventions on Protection of Humanity and Environment* [online]. B.m.: De Gruyter, s. 332–364 [vid. 2020-12-07]. ISBN 978-3-11-087481-5. Dostupné z: doi:10.1515/9783110874815-026

HOOVELD, Guido J. E. J., Jessica E. VAN MONTFOORT, Dirk K. F. MEIJER a Michael MÜLLER, 2001. Function and regulation of ATP-binding cassette transport proteins involved in hepatobiliary transport. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **12**(4), 525–543. ISSN 0928-0987. Dostupné z: doi:10.1016/S0928-0987(01)00101-4

CHAMBERS, Janice E., Edward C. MEEK a Howard W. CHAMBERS, 2016. Novel brain-penetrating oximes for reactivation of cholinesterase inhibited by sarin and VX surrogates. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1374**(1), 52–58.

CHEN, Chun, Hongyu ZHOU, Chi GUAN, Huanhuan ZHANG, Yingying LI, Xue JIANG, Zheng DONG, Yuanyuan TAO, Juan DU, Shuyao WANG, Teng ZHANG, Na DU, Junyang GUO, Yaqiong WU, Zehai SONG, Haofei LUAN, Yu WANG, Hongwen DU, Shaofeng ZHANG, Chen LI, Hang CHANG a Tao WANG, 2020. Applicability of free drug hypothesis to drugs with good membrane permeability that are not efflux transporter substrates: A microdialysis study in rats. *Pharmacology Research & Perspectives* [online]. **8**(2), e00575. ISSN 2052-1707. Dostupné z: doi:10.1002/prp2.575

CHEN, Xiaomei, Tim SLÄTTENGREN, Elizabeth C. M. DE LANGE, David E. SMITH a Margareta HAMMARLUND-UDENAES, 2017. Revisiting atenolol as a low passive permeability marker. *Fluids and Barriers of the CNS* [online]. **14** [vid. 2018-06-12]. ISSN 2045-8118. Dostupné z: doi:10.1186/s12987-017-0078-x

IRVINE, Jennifer D., Lori TAKAHASHI, Karen LOCKHART, Jonathan CHEONG, John W. TOLAN, H.E. SELICK a J.Russell GROVE, 1999. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **88**(1), 28–33. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1021/js9803205

JEONG, Hee Chun, Nam Sook KANG, No-Joong PARK, Eul Kyun YUM a Young-Sik JUNG, 2009. Reactivation potency of fluorinated pyridinium oximes for acetylcholinesterases inhibited by paraoxon organophosphorus agent. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. **19**(4), 1214–1217.

JEONG, Keunhong a Junwon CHOI, 2019. Theoretical study on the toxicity of „Novichok" agent candidates. *Royal Society Open Science* [online]. **6**(8), 190414. ISSN 2054-5703. Dostupné z: doi:10.1098/rsos.190414

JOKANOVIC, Milan, 2012. *Neurotoxic Disorders and Medical Management of Patients Poisoned with Organophosphorus and Carbamate Pesticides*.

JOOSEN, Marloes J. A., Marcel J. VAN DER SCHANS, Christian G. M. VAN DIJK, Willem C. KUIJPERS, Heleen M. WORTELBOER a Herman P. M. VAN HELDEN, 2011. Increasing oxime efficacy by blood-brain barrier modulation. *Toxicology Letters* [online]. **206**(1), 67–71. ISSN 1879-3169. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2011.05.231

JOOSEN, Marloes J. A., Stefanie M. VESTER, Jouk HAMELINK, Steven D. KLAASSEN a Roland M. VAN DEN BERG, 2016. Increasing nerve agent treatment efficacy by P-glycoprotein inhibition. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **259**(Pt B), 115–121. ISSN 1872-7786. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2016.06.012

KAISAR, Mohammad A., Ravi K. SAJJA, Shikha PRASAD, Vinay V. ABHYANKAR, Taylor LILES a Luca CUCULLO, 2017. New experimental models of the blood-brain barrier for CNS drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* [online]. **12**(1), 89–103. ISSN 1746-0441. Dostupné z: doi:10.1080/17460441.2017.1253676

KANSY, Manfred, Alex AVDEEF a Holger FISCHER, 2004. Advances in screening for membrane permeability: high-resolution PAMPA for medicinal chemists. *Drug Discovery Today. Technologies* [online]. **1**(4), 349–355. ISSN 1740-6749. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.013

KARASOVA, Jana Zdarova, Martin MZIK, Tomas KUCERA, Zbynek VECERA, Jiri KASSA a Vit SESTAK, 2020. Interaction of Cucurbit[7]uril with Oxime K027, Atropine, and Paraoxon: Risky or Advantageous Delivery System? *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(21), 7883. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21217883

KASSA, J., 2002. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. **40**(6), 803–816.

KASSA, Jiri, Jana Zdarova KARASOVA, Filip CAISBERGER, Kamil MUSILEK, Kamil KUČA a Young-Sik JUNG, 2010. A comparison of reactivating and therapeutic efficacy of the oxime K203 and its fluorinated analog (KR-22836) with currently available oximes (obidoxime,

trimedoxime, HI-6) against tabun in rats and mice. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. **25**(4), 480–484.

KAUR, Shamsheerjit, Satinderpal SINGH, Karan Singh CHAHAL a Atish PRAKASH, 2014. Potential pharmacological strategies for the improved treatment of organophosphate-induced neurotoxicity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* [online]. **92**(11), 893–911. ISSN 0008-4212. Dostupné z: doi:10.1139/cjpp-2014-0113

KENDALL, Lon V, James R OWINY, Erik D DOHM, Katie J KNAPEK, Erin S LEE, Jennifer H KOPANKE, Michael FINK, Sarah A HANSEN a Jessica D AYERS, 2018. Replacement, Refinement, and Reduction in Animal Studies With Biohazardous Agents. *ILAR Journal* [online]. **59**(2), 177–194. ISSN 1084-2020, 1930-6180. Dostupné z: doi:10.1093/ilar/ily021

KING, Andrew M. a Cynthia K. AARON, 2015. Organophosphate and Carbamate Poisoning. *Emergency Medicine Clinics of North America* [online]. **33**(1), 133–151. ISSN 07338627. Dostupné z: doi:10.1016/j.emc.2014.09.010

KLIACHYNA, Maria, Gianluca SANTONI, Valentin NUSSBAUM, Julien RENOU, Benoit SANSON, Jacques-Philippe COLLETIER, Mélanie ARBOLÉAS, Mélanie LOIODICE, Martin WEIK a Ludovic JEAN, 2014. Design, synthesis and biological evaluation of novel tetrahydroacridine pyridine-aldoxime and-amidoxime hybrids as efficient uncharged reactivators of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *European journal of medicinal chemistry*. **78**, 455–467.

KOBRLOVA, Tereza a Ondrej SOUKUP, 2020. Effect of P-glycoprotein on the availability of oxime reactivators in the brain. *Toxicology* [online]. **443**, 152541. ISSN 0300-483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2020.152541

KOKUBU, Yasuhiro, Tomoko YAMAGUCHI a Kenji KAWABATA, 2017. In vitro model of cerebral ischemia by using brain microvascular endothelial cells derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **486**(2), 577–583. ISSN 1090-2104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.092

KORABECNY, Jan, Ondrej SOUKUP, Rafael DOLEZAL, Katarina SPILOVSKA, Eugenie NEPOVIMOVA, Martin ANDRS, Thuy Duong NGUYEN, Daniel JUN, Kamil MUSILEK, Marta KUCEROVA-CHLUPACOVA a Kamil KUČA, 2014. From pyridinium-based to centrally active acetylcholinesterase reactivators. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. **14**(3), 215–221. ISSN 1875-5607.

KOVARIK, Zrinka, Nikolina MAČEK, Rakesh K. SIT, Zoran RADIĆ, Valery V. FOKIN, K. BARRY SHARPLESS a Palmer TAYLOR, 2013. Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **203**(1), 77–80. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2012.08.019

KREUTER, Jörg, Renad N. ALYAUTDIN, Dimitri A. KHARKEVICH a Alexei A. IVANOV, 1995. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain research*. **674**(1), 171–174.

KRISHNAN, Jishnu K.S., Peethambaran ARUN, Abhilash P. APPU, Nivetha VIJAYAKUMAR, Taíza H. FIGUEIREDO, Maria F. M. BRAGA, Sudikshya BASKOTA, Cara H. OLSEN, Natalia FARKAS, John DAGATA, William H. FREY, John R. MOFFETT a Aryan M. A. NAMBOODIRI, 2016. Intranasal Delivery of Obidoxime to the Brain Prevents Mortality

and CNS Damage from Organophosphate Poisoning. *Neurotoxicology* [online]. **53**, 64–73. ISSN 0161-813X. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuro.2015.12.020

KUTEYKIN-TEPLYAKOV, Konstantin, Carlos LUNA-TORTÓS, Kamila AMBROZIAK a Wolfgang LÖSCHER, 2010. Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. *British Journal of Pharmacology* [online]. **160**(6), 1453–1463. ISSN 0007-1188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00801.x

LAGONA, Jason, Pritam MUKHOPADHYAY, Sriparna CHAKRABARTI a Lyle ISAACS, 2005. The cucurbit[n]uril family. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* [online]. **44**(31), 4844–4870. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.200460675

LEE, P. a D.Y.H. TAI, 2001. Clinical features of patients with acute organophosphate poisoning requiring intensive care. *Intensive Care Medicine* [online]. **27**(4), 694–699. ISSN 0342-4642, 1432-1238. Dostupné z: doi:10.1007/s001340100895

LI, Yuan, Xueying SUN, Houfu LIU, Liang HUANG, Guofeng MENG, Yu DING, Wenji SU, Jiaqi LU, Sophie GONG, Georg C. TERSTAPPEN, Ru ZHANG a Wandong ZHANG, 2019. Development of Human in vitro Brain-blood Barrier Model from Induced Pluripotent Stem Cell-derived Endothelial Cells to Predict the in vivo Permeability of Drugs. *Neuroscience Bulletin* [online]. **35**(6), 996–1010. ISSN 1995-8218. Dostupné z: doi:10.1007/s12264-019-00384-7

LINDSLEY, Craig W., 2010. Lipophilicity. In: Ian P. STOLERMAN a Lawrence H. PRICE, ed. *Encyclopedia of Psychopharmacology* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, s. 1–6 [vid. 2020-10-14]. ISBN 978-3-642-27772-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-642-27772-6_7015-1

LIU, Simin, Christian RUSPIC, Pritam MUKHOPADHYAY, Sriparna CHAKRABARTI, Peter Y. ZAVALIJ a Lyle ISAACS, 2005. The Cucurbit[n]uril Family: Prime Components for Self-Sorting Systems. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **127**(45), 15959–15967. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja055013x

LOH, Yince, Margaret M. SWANBERG, M. Victoria INGRAM a Jonathan NEWMARK, 2010. Case report: Long-term cognitive sequelae of sarin exposure. *Neurotoxicology* [online]. **31**(2), 244–246. ISSN 1872-9711. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuro.2009.12.004

LORKE, D. E., H. KALASZ, G. A. PETROIANU a K. TEKES, 2008. Entry of oximes into the brain: a review. *Current medicinal chemistry*. **15**(8), 743–753.

MALE, David K., 2009. Expression and induction of p-glycoprotein-1 on cultured human brain endothelium. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* [online]. **29**(11), 1760–1763. ISSN 1559-7016. Dostupné z: doi:10.1038/jcbfm.2009.101

MANN, T. M., M. E. PRICE, C. L. WHITMORE, R. L. PERROTT, T. R. LAWS, R. R. MCCOLM, E. R. EMERY, J. E. H. TATTERSALL, A. C. GREEN a H. RICE, 2018. Bioscavenger is effective as a delayed therapeutic intervention following percutaneous VX poisoning in the guinea-pig. *Toxicology Letters* [online]. **293**, 198–206. ISSN 1879-3169. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2017.11.029

MARRS, Timothy C., 1993. Organophosphate poisoning. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **58**(1), 51–66. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/0163-7258(93)90066-M

MASSON, Patrick a Oksana LOCKRIDGE, 2010. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: Catalytic complexities and hysteretic behavior. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. **494**(2), 107–120. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2009.12.005

MAXWELL, Donald M., Karen M. BRECHT a Richard E. SWEENEY, 2013. A common mechanism for resistance to oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **203**(1), 72–76. ISSN 1872-7786. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2012.08.024

MCCALL, A. L., W. R. MILLINGTON a R. J. WURTMAN, 1982. Blood-brain barrier transport of caffeine: Dose-related restriction of adenine transport. *Life Sciences* [online]. **31**(24), 2709–2715. ISSN 0024-3205. Dostupné z: doi:10.1016/0024-3205(82)90715-9

MEERHOFF, Gideon F., Stefanie M. VESTER, Peter HESSELING, Steven D. KLAASSEN, Alex S. CORNELISSEN, Paul J. LUCASSEN a Marloes J. A. JOOSEN, 2018. Potentiation of antiseizure and neuroprotective efficacy of standard nerve agent treatment by addition of tariquidar. *Neurotoxicology* [online]. **68**, 167–176. ISSN 1872-9711. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuro.2018.08.005

MENSCH, Jurgen, Julen OYARZABAL, Claire MACKIE a Patrick AUGUSTIJNS, 2009. In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **98**(12), 4429–4468. ISSN 1520-6017. Dostupné z: doi:10.1002/jps.21745

MERCEY, Guillaume, Tristan VERDELET, Julien RENOU, Maria KLIACHYNA, Rachid BAATI, Florian NACHON, Ludovic JEAN a Pierre-Yves RENARD, 2012. Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents. *Accounts of Chemical Research* [online]. **45**(5), 756–766. ISSN 0001-4842, 1520-4898. Dostupné z: doi:10.1021/ar2002864

MERCEY, Guillaume, Tristan VERDELET, Géraldine SAINT-ANDRÉ, Emilie GILLON, Alain WAGNER, Rachid BAATI, Ludovic JEAN, Florian NACHON a Pierre-Yves RENARD, 2011. First efficient uncharged reactivators for the dephosphylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chemical Communications (Cambridge, England)* [online]. **47**(18), 5295–5297. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/c1cc10787a

MONTES-NAVAJAS, Pedro, María GONZÁLEZ-BÉJAR, J. C. SCAIANO a Hermenegildo GARCÍA, 2009. Cucurbituril complexes cross the cell membrane. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* [online]. **8**(12), 1743–1747. ISSN 1474-9092. Dostupné z: doi:10.1039/b9pp00041k

NAGAO, Masataka, Takehiko TAKATORI, Yukimasa MATSUDA, Makoto NAKAJIMA, Hirotarō IWASE a Kimiharu IWADATE, 1997. Definitive Evidence for the Acute Sarin Poisoning Diagnosis in the Tokyo Subway. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **144**(1), 198–203. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1006/taap.1997.8110

NAIK, Pooja a Luca CUCULLO, 2012. In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. **101**(4), 1337–1354. ISSN 1520-6017. Dostupné z: doi:10.1002/jps.23022

NAKAGAWA, Shinsuke, Mária A. DELI, Hiroko KAWAGUCHI, Takeshi SHIMIZUDANI, Takanori SHIMONO, Agnes KITTEL, Kunihiko TANAKA a Masami NIWA, 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International* [online]. **54**(3–4), 253–263. ISSN 1872-9754. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuint.2008.12.002

NAKAGAWA, Shinsuke, Mária A. DELI, Shinobu NAKAO, Masaru HONDA, Kentaro HAYASHI, Ryota NAKAOKE, Yasufumi KATAOKA a Masami NIWA, 2007. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* [online]. **27**(6), 687–694. ISSN 0272-4340. Dostupné z: doi:10.1007/s10571-007-9195-4

NATOLI, Manuela, Bruno D. LEONI, Igea D'AGNANO, Flavia ZUCCO a Armando FELSANI, 2012. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA* [online]. **26**(8), 1243–1246. ISSN 1879-3177. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2012.03.009

OKUNO, Sou, Koichi SAKURADA, Hikoto OHTA, Hiroshi IKEGAYA, Yuko KAZUI, Tomoko AKUTSU, Takehiko TAKATORI a Kimiharu IWADATE, 2008. Blood–brain barrier penetration of novel pyridinealdoxime methiodide (PAM)-type oximes examined by brain microdialysis with LC-MS/MS. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **227**(1), 8–15. ISSN 0041-008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2007.09.021

PAGE, Shyanne, Ronak PATEL, Snehal RAUT a Abraham AL-AHMAD, 2020. Neurological diseases at the blood-brain barrier: Stemming new scientific paradigms using patient-derived induced pluripotent cells. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* [online]. **1866**(4), 165358. ISSN 1879-260X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2018.12.009

PARDRIDGE, William M., 2005. The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development. *NeuroRX* [online]. **2**(1), The Blood-Brain Barrier and Neurotherapeutics, 3–14. ISSN 1545-5343. Dostupné z: doi:10.1602/neurorx.2.1.3

PASHIROVA, Tatiana N., Irina V. ZUEVA, Konstantin A. PETROV, Vasily M. BABAEV, Svetlana S. LUKASHENKO, Ildar Kh RIZVANOV, Eliana B. SOUTO, Evgeny E. NIKOLSKY, Lucia Ya ZAKHAROVA a Patrick MASSON, 2017. Nanoparticle-Delivered 2-PAM for Rat Brain Protection against Paraoxon Central Toxicity. *ACS applied materials & interfaces*. **9**(20), 16922–16932.

PATOČKA, Jiří, 2004. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-0608-5.

POLLER, Birk, Heike GUTMANN, Stephan KRÄHENBÜHL, Babette WEKSLER, Ignacio ROMERO, Pierre-Olivier COURAUD, Gerald TUFFIN, Jürgen DREWE a Jörg HUWYLER, 2008. The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. *Journal of Neurochemistry*. **107**(5), 1358–1368. ISSN 1471-4159.

POLLI, J. W., S. A. WRING, J. E. HUMPHREYS, L. HUANG, J. B. MORGAN, L. O. WEBSTER a C. S. SERABJIT-SINGH, 2001. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **299**(2), 620–628. ISSN 0022-3565.

QUAN, Yong, Yisheng JIN, Teresa N. FARIA, Charles A. TILFORD, Aiqing HE, Doris A. WALL, Ronald L. SMITH a Balvinder S. VIG, 2012. Expression Profile of Drug and Nutrient Absorption Related Genes in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Cells Grown under

Differentiation Conditions. *Pharmaceutics* [online]. **4**(2), 314–333. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics4020314

QUINN, Daniel M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews* [online]. **87**(5), 955–979. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/cr00081a005

RADIĆ, Zoran, Rakesh K. SIT, Zrinka KOVARIK, Suzana BEREND, Edzna GARCIA, Limin ZHANG, Gabriel AMITAI, Carol GREEN, Božica RADIĆ, Valery V. FOKIN, K. Barry SHARPLESS a Palmer TAYLOR, 2012. Refinement of Structural Leads for Centrally Acting Oxime Reactivators of Phosphylated Cholinesterases. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **287**(15), 11798–11809. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M111.333732

RACHAMAN, E. S., Y. ASHANI, H. LEADER, I. GRANOTH, H. EDERY a G. PORATH, 1979. Sugar-oximes, new potential antidotes against organophosphorus poisoning. *Arzneimittel-Forschung*. **29**(6), 875–876.

RENOU, Julien, Mélanie LOIODICE, Mélanie ARBOLÉAS, Rachid BAATI, Ludovic JEAN, Florian NACHON a Pierre-Yves RENARD, 2014. Tryptoline-3-hydroxypyridinaldoxime conjugates as efficient reactivators of phosphylated human acetyl and butyrylcholinesterases. *Chemical Communications*. **50**(30), 3947–3950.

RENOU, Julien, Guillaume MERCEY, Tristan VERDELET, Emilia PĂUNESCU, Emilie GILLON, Mélanie ARBOLÉAS, Mélanie LOIODICE, Maria KLIACHYNA, Rachid BAATI a Florian NACHON, 2013. Syntheses and in vitro evaluations of uncharged reactivators for human acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Chemico-biological interactions*. **203**(1), 81–84.

RILEY, Bernard, 2003. The toxicology and treatment of injuries from chemical warfare agents. *Current Anaesthesia and Critical Care*. **14**(3), 149–154.

ROBB, Erika L. a Mari B. BAKER, 2020. Organophosphate Toxicity. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing [vid. 2020-07-01]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470430/>

ROSENBERG, Yvonne J., Lingjun MAO, Xiaoming JIANG, Jonathan LEES, Limin ZHANG, Zoran RADIC a Palmer TAYLOR, 2017. Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reverses early and advanced symptoms in macaques exposed to sarin vapor. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **274**, 50–57. ISSN 1872-7786. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2017.07.003

ROSENBERG, Yvonne J., Jerry WANG, Tara OOMS, Narayanan RAJENDRAN, Lingjun MAO, Xiaoming JIANG, Jonathan LEES, Lori URBAN, Jeremiah D. MOMPER, Yadira SEPULVEDA, Yan-Jye SHYONG a Palmer TAYLOR, 2018. Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reactivates and reverses advanced symptoms of lethal inhaled paraoxon in macaques. *Toxicology Letters* [online]. **293**, 229–234. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2017.10.025

SARAIVA, Cláudia, Catarina PRAÇA, Raquel FERREIRA, Tiago SANTOS, Lino FERREIRA a Liliana BERNARDINO, 2016. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *Journal of Controlled Release*. **235**, 34–47.

SETYAWATI, Magdiel I., Vadym N. MOCHALIN a David T. LEONG, 2016. Tuning Endothelial Permeability with Functionalized Nanodiamonds. *ACS nano* [online]. **10**(1), 1170–1181. ISSN 1936-086X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.nano.5b06487

SHIH, Tsung-Ming, John A. GUARISCO, Todd M. MYERS, Robert K. KAN a John H. MCDONOUGH, 2011. The oxime pro-2-PAM provides minimal protection against the CNS effects of the nerve agents sarin, cyclosarin, and VX in guinea pigs. *Toxicology mechanisms and methods*. **21**(1), 53–62.

SHIH, Tsung-Ming, Irwin KOPLOVITZ, Robert K. KAN a John H. MCDONOUGH, 2012. *In search of an effective in vivo reactivator for organophosphorus nerve agent-inhibited acetylcholinesterase in the central nervous system*. B.m.: ARMY MEDICAL RESEARCH INST OF CHEMICAL DEFENSE ABERDEEN PROVING GROUND MD PHARMACOLOGY BRANCH.

SIDDHARTHAN, Venkatraman, Yuri V. KIM, Suyi LIU a Kwang Sik KIM, 2007. Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Research* [online]. **1147**, 39–50. ISSN 0006-8993. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainres.2007.02.029

SIDELL, Frederick R., 1974. Soman and Sarin: Clinical Manifestations and Treatment of Accident of Accidental Poisoning by Organophosphates. *Clinical Toxicology* [online]. **7**(1), 1–17. ISSN 0009-9309. Dostupné z: doi:10.3109/15563657408987971

SIT, Rakesh K., Zoran RADIĆ, Valeria GERARDI, Limin ZHANG, Edzna GARCIA, Maja KATALINIĆ, Gabriel AMITAI, Zrinka KOVARIK, Valery V. FOKIN a K. Barry SHARPLESS, 2011. New structural scaffolds for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *Journal of Biological Chemistry*. **286**(22), 19422–19430.

SOUKUP, Ondrej, Jan KORABECNY, David MALINAK, Eugenie NEPOVIMOVA, Ngoc L. PHAM, Kamil MUSILEK, Martina HRABINOVA, Vendula HEPNAROVA, Rafael DOLEZAL, Petr PAVEK, Petr JOST, Tereza KOBRLOVA, Jana JANKOCKOVA, Lukas GORECKI, Miroslav PSOTKA, Thuy D. NGUYEN, Karl BOX, Breeze OUTHWAITE, Martina CECKOVA, Ales SORF, Daniel JUN a Kamil KUCA, 2018. *In vitro and in silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning - a New Hope or a Blind Alley?* [online] [vid. 2018-09-22]. Dostupné z: doi:info:doi/10.2174/1573406414666180112105657

SRINIVASAN, Balaji, Aditya Reddy KOLLI, Mandy Brigitte ESCH, Hasan Erbil ABACI, Michael L. SHULER a James J. HICKMAN, 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation* [online]. **20**(2), 107–126. ISSN 2211-0682. Dostupné z: doi:10.1177/2211068214561025

TAVELIN, Staffan, Johan GRÅSJÖ, Jan TAIPALENSUU, Göran OCKLIND a Per ARTURSSON, 2002. Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. **188**, 233–272. ISSN 1064-3745. Dostupné z: doi:10.1385/1-59259-185-X:233

TEKSIN, Zeynep S., Kelli HOM, Anand BALAKRISHNAN a James E. POLLI, 2006. Ion pair-mediated transport of metoprolol across a three lipid-component PAMPA system. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* [online]. **116**(1), 50–57. ISSN 0168-3659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2006.08.020

- TEKSIN, Zeynep S., Paul R. SEO a James E. POLLI, 2010. Comparison of Drug Permeabilities and BCS Classification: Three Lipid-Component PAMPA System Method versus Caco-2 Monolayers. *The AAPS Journal* [online]. **12**(2), 238–241. ISSN 1550-7416. Dostupné z: doi:10.1208/s12248-010-9176-2
- TERRY, A. V., 2012. Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **134**(3), 355–365. ISSN 1879-016X. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2012.03.001
- TOXICOLOGY, National Research Council (US) Committee on, 1997. *Review of Acute Human-Toxicity Estimates for GB (Sarin)* [online]. B.m.: National Academies Press (US) [vid. 2020-08-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK233733/>
- VATINE, Gad D., Riccardo BARRILE, Michael J. WORKMAN, Samuel SANCES, Bianca K. BARRIGA, Matthew RAHNAMA, Sonalee BARTHAKUR, Magdalena KASENDRA, Carolina LUCCHESI, Jordan KERNS, Norman WEN, Weston R. SPIVIA, Zhaohui CHEN, Jennifer VAN EYK a Clive N. SVENDSEN, 2019. Human iPSC-Derived Blood-Brain Barrier Chips Enable Disease Modeling and Personalized Medicine Applications. *Cell Stem Cell* [online]. **24**(6), 995-1005.e6. ISSN 1934-5909. Dostupné z: doi:10.1016/j.stem.2019.05.011
- VESZELKA, Szilvia, András TÓTH, Fruzsina R. WALTER, Andrea E. TÓTH, Ilona GRÓF, Mária MÉSZÁROS, Alexandra BOCSIK, Éva HELLINGER, Monika VASTAG, Gábor RÁKHELY a Mária A. DELI, 2018. Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [online]. **11** [vid. 2020-11-20]. ISSN 1662-5099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2018.00166
- VOICU, Victor A., Andrei Valentin MEDVEDOVICI, Koichi SAKURADA, Hikoto OHTA, Flavian Ștefan RĂDULESCU a Dalia Simona MIRON, 2016. The forgotten or underestimated relevance of biopharmaceutical-based assessments for the oral absorption studies of oxime reactivators. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* [online]. **12**(7), 743–752. ISSN 1742-5255. Dostupné z: doi:10.1080/17425255.2016.1179282
- WADIA, R. S., C. SADAGOPAN, R. B. AMIN a H. V. SARDESAI, 1974. Neurological manifestations of organophosphorous insecticide poisoning. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* [online]. **37**(7), 841–847. ISSN 0022-3050. Dostupné z: doi:10.1136/jnnp.37.7.841
- WAGNER, Sylvia, Jürgen KUFLEITNER, Anja ZENSI, Miriam DADPARVAR, Sascha WIEN, Judith BUNGERT, Tikva VOGEL, Franz WOREK, Jörg KREUTER a Hagen VON BRIESEN, 2010. Nanoparticulate transport of oximes over an in vitro blood-brain barrier model. *PLoS One*. **5**(12), e14213.
- WANG, Edina C. a Andrew Z. WANG, 2014. NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATIONS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* [online]. **6**(1), 9–26. ISSN 1757-9694. Dostupné z: doi:10.1039/c3ib40165k
- WANG, Hai-Yan, Yang ZHOU, Ji-Hong LU, Qing-Yun LIU, Gui-Ying CHEN, Zhu TAO a Xin XIAO, 2020. Supramolecular drug inclusion complex of Capecitabine with cucurbit[7]uril and inverted cucurbit[7]uril. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. **13**(1), 2271–2275. ISSN 1878-5352. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2018.04.011

- WANG, Qing, Joseph D. RAGER, Kathryn WEINSTEIN, Paula S. KARDOS, Glenn L. DOBSON, Jibin LI a Ismael J. HIDALGO, 2005. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. **288**(2), 349–359. ISSN 0378-5173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2004.10.007
- WEI, Zhao, Yan-Qin LIU, Xin-Bo ZHOU, Yuan LUO, Chun-Qian HUANG, Yong-An WANG, Zhi-Bing ZHENG a Song LI, 2014. New efficient imidazolium aldoxime reactivators for nerve agent-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. **24**(24), 5743–5748. ISSN 1464-3405. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2014.10.055
- WEKSLER, Babette, Ignacio A. ROMERO a Pierre-Olivier COURAUD, 2013. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and barriers of the CNS* [online]. **10**(1), 16. ISSN 2045-8118. Dostupné z: doi:10.1186/2045-8118-10-16
- WHEATE, Nial J., Damian P. BUCK, Anthony I. DAY a J. Grant COLLINS, 2006. Cucurbit[n]uril binding of platinum anticancer complexes. *Dalton Transactions* [online]. (3), 451–458. ISSN 1477-9234. Dostupné z: doi:10.1039/B513197A
- WILCZEWSKA, Agnieszka Z., Katarzyna NIEMIROWICZ, Karolina H. MARKIEWICZ a Halina CAR, 2012. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological reports*. **64**(5), 1020–1037.
- WILHELM, Christina M., Thomas H. SNIDER, Michael C. BABIN, David A. JETT, Gennady E. PLATOFF a David T. YEUNG, 2014. A comprehensive evaluation of the efficacy of leading oxime therapies in guinea pigs exposed to organophosphorus chemical warfare agents or pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **281**(3), 254–265. ISSN 0041008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2014.10.009
- WILHELM, Imola a István A. KRIZBAI, 2014. In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier for the Study of Drug Delivery to the Brain. *Molecular Pharmaceutics* [online]. **11**(7), 1949–1963. ISSN 1543-8384, 1543-8392. Dostupné z: doi:10.1021/mp500046f
- WILKINSON, Jenny M. a Irina POLLARD, 1993. Accumulation of theophylline, theobromine and paraxanthine in the fetal rat brain following a single oral dose of caffeine. *Developmental Brain Research* [online]. **75**(2), 193–199. ISSN 01653806. Dostupné z: doi:10.1016/0165-3806(93)90023-4
- WOREK, Franz, Horst THIERMANN, Ladislaus SZINICZ a Peter EYER, 2004. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochemical Pharmacology* [online]. **68**(11), 2237–2248. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2004.07.038
- WOREK, Franz, Horst THIERMANN a Timo WILLE, 2016. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **259**, 93–98. ISSN 00092797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2016.04.032
- WYMAN, Ian W. a Donal H. MACARTNEY, 2009. Host–guest complexations of local anaesthetics by cucurbit[7]uril in aqueous solution. *Organic & Biomolecular Chemistry* [online]. **8**(1), 247–252. ISSN 1477-0539. Dostupné z: doi:10.1039/B915694A
- YANAGISAWA, N, H MORITA, T NAKAJIMA, H OKUDERA, M SHIMIZU, H HIRABAYASHI, M NOHARA, Y MIDORIKAWA a S MIMURA, 1995. Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *The Lancet* [online]. **346**(8970), 290–293. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(95)92170-2

YANG, Jun, Lixue FAN, Feijian WANG, Yuan LUO, Xin SUI, Wanhua LI, Xiaohong ZHANG a Yongan WANG, 2016. Rapid-releasing of HI-6 via brain-targeted mesoporous silica nanoparticles for nerve agent detoxification. *Nanoscale*. **8**(18), 9537–9547.

YOON, Chi Ho, Soo Jin KIM, Beom Soo SHIN, Kang Choon LEE a Sun Dong YOO, 2006. Rapid screening of blood-brain barrier penetration of drugs using the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column chromatography. *Journal of Biomolecular Screening* [online]. **11**(1), 13–20. ISSN 1087-0571. Dostupné z: doi:10.1177/1087057105281656

ZARGHI, Afshin a Sara ARFAEI, 2011. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*. **10**(4), 655–683. ISSN 1735-0328.

ZHANG, Lei, John M. STRONG, Wei QIU, Lawrence J. LESKO a Shiew-Mei HUANG, 2006. Scientific perspectives on drug transporters and their role in drug interactions. *Molecular Pharmaceutics* [online]. **3**(1), 62–69. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp050095h

ZOLTANI, Csaba K., 2009. Cardiovascular System as a Target of Chemical Warfare Agents. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* [online]. B.m.: Elsevier, s. 493–507 [vid. 2018-03-12]. ISBN 978-0-12-374484-5. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012374484-5.00034-1

ZORBAZ, Tamara, David MALINAK, Nikola MARAKOVIĆ, Nikolina MAČEK HRVAT, Antonio ZANDONA, Michal NOVOTNY, Adam SKARKA, Rudolf ANDRYS, Marketa BENKOVA, Ondrej SOUKUP, Maja KATALINIĆ, Kamil KUČA, Zrinka KOVARIK a Kamil MUSILEK, 2018. Pyridinium Oximes with Ortho-Positioned Chlorine Moiety Exhibit Improved Physicochemical Properties and Efficient Reactivation of Human Acetylcholinesterase Inhibited by Several Nerve Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **61**(23), 10753–10766. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01398

ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, Jana, 2017. Toxic Effects of Pesticides. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. **80/113**(2), 164–171. ISSN 12107859, 18024041. Dostupné z: doi:10.14735/amcsnn2017164

ŽDÁROVÁ KARASOVÁ, Jana, Filip ZEMEK, Jiří KASSA a Kamil KUČA, 2014. Entry of oxime K027 into the different parts of rat brain: Comparison with obidoxime and oxime HI-6. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. **12**(1), 25–29. ISSN 1214-021X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jab.2013.01.001

Přiložené publikace

8.1 Seznam publikací k tématu dizertační práce

Publikace 1 Kobřlová T., Soukup O.: Effect of P-glycoprotein on the availability of oxime reactivators in the brain. *Toxicology*, 443, 2020: 152541.

Publikace 2 Kobřlová T., Korábečný J., Soukup O.: Current approaches to enhancing oxime reactivator delivery into the brain. *Toxicology*, 423, 2019:75-83.

Publikace 3 Godyn J., Gucwa D., Kobřlová T., Novák M., Soukup O., Malawska B., Bajda M.: Novel application of capillary electrophoresis with a liposome coated capillary for prediction of blood-brain barrier permeability. *Talanta*, 217, 2020:121023.

Publikace 4 Górecki L., Junová L., Kučera T., Hepnarová V., Prchal L., Kobřlová T., Múčková E., Soukup O., Korábečný J.: Tacroximes: novel unique compounds for the recovery of organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase. *Future Medicinal Chemistry*, 11, 2019:2625-2634.

Publikace 5 Soukup O., Korábečný J., Maliňák D., Nepovimová E., Pham N., Musílek K., Hrabínová M., Hepnarová V., Doležal R., Pávek P., Jošt P., Kobřlová T., Janočková J., Górecki L., Psoťka M., Nguyen TD., Box K., Outhwaite B., Čečková M., Šorf A., Jun D., Kuča K.: In vitro and in silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning – a New Hope or a Blind Alley? *Medicinal Chemistry*, 14, 2018:281-292.

Následující dvě publikace jsou k dnešnímu datu (11.12.2020) odeslány po zrevidování do redakce. Obě práce byly v prvním kole oponentského řízení doporučeny ke korekci jako *minor revision*. Z hlediska práce jsou důležité, proto jsou přiloženy, ačkoliv ještě nebyly přijaty.

Konečný J., Misiachna A., Hrabínová M., Pulkrábková L., Benková M., Prchal L., Kučera T., Kobrllová T., Finger V., Kolcheva M., Kortus Š., Jun D., Valko M., Horák M., Soukup O., Korábečný J.: Pursuing the Complexity of Alzheimer's Disease: Discovery of Fluoren-9-Amines as Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors and N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonists. *Biomolecules*.

Míra zapojení autora dizertační práce:

- stanovení predikce penetrace zkoumaných látek skrz HEB hCMEC/D3 metodou
- vyhodnocení dat včetně statistického zpracování

Gorecki L., Hepnarová V., Žďárová Karasová J., Hrabínová M., Courageux C., Dias J., Kučera T., Kobrllová T., Múčková L., Prchal L., Malinák D., Jun D., Musilek K., Worek F., Nachon F., Soukup O., Korabecny, Jan.: Development of versatile and highly potent monoquatarnary reactivators of acetylcholinesterase. *Archives of Toxicology*.

Míra zapojení autora dizertační práce:

- stanovení predikce penetrace zkoumaných látek skrz HEB metodou PAMPA a MDCK
- vyhodnocení dat včetně statistického zpracování
- *in vivo* farmakokinetika látek

8.2 Seznam publikací nad rámec tématu dizertační práce

- Publikace 6** Mezeiová E., Janočková J., Konečný J., Kobřlová T., Pasdiorová M., Doležal R., Prchal L., Žďárová Karasová J., Soukup O., Korábečný J.: From orexin receptor agonist YNT-185 to novel antagonists with drug-like properties for the treatment of insomnia. *Bioorganic Chemistry*, 103, 2020: 104-179.
- Publikace 7** Maříková J., Ritomská A., Korábečný J., Peřinová R., Al Mamun A., Kučera T., Kohelová E., Hulcová D., Kobřlová T., Kuneš J., Nováková L., Cahlíková L.: Aromatic Esters of the Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Ambelline as Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Journal of Natural Products*, 83, 2020:1359-1367.
- Publikace 8** Sobolová K., Hrabínová M., Hepnarová V., Kučera T., Kobřlová T., Benková M., Janočková J., Doležal R., Prchal L., Benek O., Mezeiová E., Jun D., Soukup O., Korábečný J.: Discovery of novel berberine derivatives with balanced cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition profile. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 203, 2020:112593.
- Publikace 9** Svobodová B., Mezeiová E., Hepnarová V., Hrabínová M., Můčková L., Kobřlová T., Jun D., Soukup O., Luisa J., Maria M., Jose A., Korábečný J.: Exploring Structure-Activity Relationship in Tacrine-Squaramide Derivatives as Potent Cholinesterase Inhibitors. *Biomolecules*. 8(9), 2019:379.
- Publikace 10** Nepovimová E., Janočková J., Misík J., Kubík S., Stuchlík A., Valeš K., Korábečný J., Mezeiová E., Doležal R., Soukup O., Kobřlová T., Pham NL., Nguyen TD., Konečný J., Kuča K.: Orexin supplementation in narcolepsy treatment: A review. *Medicinal Research Reviews*, 39, 2019:961-975.
- Publikace 11** Malek R., Arribas RL., Palomino-Antolin A., Totoston P., Demougeot C., Kobřlová T., Soukup O., Iriepa I., Moraleda I., Diez-Iriepa D., Godyn J., Panek D., Malawska B., Gluch-Lutwin M., Mordyl B., Siwek A., Chabchoub F., Marco-Contelles J., Kiec-Kononowicz K., Egea J., de los Rios C., Ismaili L.: New dual small molecules for Alzheimer's disease therapy combining histamine H-3 receptor (H3R) antagonism and calcium channels blockade with additional Cholinesterase inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 2019:11416-11422.
- Publikace 12** Kaniakova M., Nepovimová E., Kleteckova L., Skrenkova K., Holubová K., Chrienova Z., Hepnarová V., Kučera T., Kobřlová T., Valeš K., Korábečný J., Soukup O., Horák M.: Combination of Memantine and 6-Chlorotacrine as Novel Multi-Target Compound against Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research*, 16, 2019:821-833.
- Publikace 13** Soares Romeiro LA., da Costa Nunes JL., Miranda CdO., Heyn Roth Cardoso GS., de Oliveira AS., Gandini A., Kobřlová T., Soukup O., Rossi M., Senger J., Jung M., Gervasoni S., Vistoli G., Petralla S., Massenzio F., Monti B., Bolognesi ML.: Novel sustainable-by-design HDAC inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10, 2019:671-676.
- Publikace 14** Janočková J., Doležal R., Nepovimová E., Kobřlová T., Benková M., Kuča K., Konečný J., Mezeiová E., Melikova M., Hepnarová V., Ring A., Soukup O., Korábečný J.: Investigation of new orexin 2 receptor modulators using in silico and in vitro methods. *Molecules*, 23, 2018:2926
- Publikace 15** De Simone A., Bartolini M., Baschieri A., Apperley K., Chen H., Guardigni M., Montanari S., Kobřlová T., Soukup O., Valgimigli L., Andrisano V., Keillor J., Basso M.,

Milelli A.: Hydroxy-substituted trans-cinnamoyl derivatives as multifunctional tools in the context of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 139, 2017:378-389.

Publikace 1

Kobřlova T., Soukup O.: Effect of P-glycoprotein on the availability of oxime reactivators in the brain. *Toxicology*. 443, 2020: 152541.

Míra zapojení autora dizertační práce:

- vlastní text publikace
- tvorba a zpracování obrazových příloh
- validace metody využívající CACO-2 buněčnou linii
- stanovení interakce oximových reaktivátorů s Pgp
- vyhodnocení dat včetně statistického zpracování



Short communication

Effect of P-glycoprotein on the availability of oxime reactivators in the brain

Tereza Koblířová^{a,b}, Ondřej Soukup^{a,b,*}

^a Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic
^b Biomedical Research Centre, University Hospital, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:
 Reactivator
 Oxime
 Blood brain barrier
 Organophosphate
 P-glycoprotein
 CACO-2

ABSTRACT

The ability to overcome cellular barriers in the body is crucial for efficient delivery of drugs to the target where intervention is needed. For drugs acting in the brain it is essential to overcome the blood-brain barrier (BBB). Such drugs include antidotes for the treatment of organophosphate poisoning, a current warfare and terrorist threat. Being lipophilic compounds, organophosphates readily penetrate the brain and block the enzyme acetylcholinesterase (AChE). They cause severe symptoms which may have fatal consequences. A major drawback of currently available oxime reactivators is their inability to reactivate AChE in the central nervous system (CNS) as they are unable to cross the blood-brain barrier. An important obstacle preventing many drugs from reaching their therapeutic target in the brain is the efflux transporter P-glycoprotein (P-gp), whose function is to prevent the penetration of potentially harmful substances. The aim of this study was to evaluate the effect of P-gp on the permeation of oximes into the brain. The study of this interaction was carried out on the CACO-2 cell line, stably expressing P-gp. As it turned out, P-gp has no essential influence on the central availability of clinically used oxime reactivators within this study.

1. Introduction

Organophosphates (OPs) are chemical substances that may be components of pesticides, herbicides and insecticides. In addition to their usefulness in agriculture, the OP group contains also the highly toxic so-called nerve agents, which currently represent one of the greatest threats worldwide. OPs have been misused in many conflicts during the last 50 years, including the Iran-Iraq war, the Tokyo subway attack, and the Syrian civil war, and for assassination purposes against Kim Jong-nam in Malaysia and probably Sergei Skripal in United Kingdom.

Acetylcholinesterase (AChE) hydrolyses the neurotransmitter acetylcholine (ACh) into choline and acetic acid, thereby terminating its effect on muscarinic (mAChRs) and nicotinic (nAChRs) acetylcholine receptors in peripheral nerves and in the central nervous system (CNS). OPs irreversibly bind the enzyme AChE, which leads to overstimulation of both mAChRs and nAChRs. An excessive amount of ACh at neuromuscular junctions and neuronal synapses causes a cholinergic crisis manifesting typical clinical symptoms according to receptor localization. Seizures, agitation and at high doses, respiratory failure point to central symptoms. In the periphery, OPs cause salivation, lacrimation, miosis, blurry vision, sweating and bronchospasm. Bronchoconstriction and spasm of breathing muscles in combination with central breathing

depression may lead to death (Bajgar, 2004).

Current treatment is based on a combination of anticholinergics (e.g. atropine, benactyzine), anticonvulsants (e.g. diazepam), and cholinesterase reactivators (obidoxime, pralidoxime, methoxime, trimedoxime and asoxime) (Antonijvic et al., 2002). Reactivators speed up the process of reactivation of inhibited AChE and restore its function. There are several problems in this process: 1) aging of OP-inhibited AChE prevents binding of reactivator, 2) there is no broad-spectrum reactivator for OPs, and foremost 3) oxime reactivators do not pass into the CNS in therapeutically relevant concentration (Mercey et al., 2012; Korabecny et al., 2014). Despite intensive research in this field, there is still no available universal, effective and centrally-active reactivator.

The major issue is that oxime reactivators do not penetrate the brain (just 4–10 % of the plasma level reaches the brain). Since the organophosphates easily overcome the blood-brain barrier (BBB), brain damage is unavoidable and at a minimum may result in persistent brain disorder (Lorke et al., 2008). Several approaches including delivery via nanoparticles, enhancement of lipophilicity, intranasal administration, synthesis of prodrugs or sugar-oxime receptor mediated transport have been tried to improve the central availability of reactivators (for review see Reference 6). However, no successful way of improving brain delivery while maintaining efficacy and low toxicity has yet been discovered (Mercey et al., 2012).

* Corresponding author at: Biomedical Research Centre, University Hospital, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic.
 E-mail address: ondrej.soukup@fmhk.cz (O. Soukup).

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152541>

Received 8 May 2020; Received in revised form 23 July 2020; Accepted 23 July 2020

Available online 22 August 2020

0300-483X/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

The BBB acts as a membrane that protects the brain from the entrance of foreign substances. It is formed by endothelial cells (EC) fitting tightly to the perivascular pericytes and astrocytes (Abbott et al., 2006). The EC are firmly connected by tight junctions (TJs) and have no fenestrations, thus blocking the transcellular pathway (Daneman and Prat, 2015). Successful permeation of a molecule to the brain is determined amongst others by its lipophilicity, molecular weight and charge. Due to these unique features, almost 100 % of large molecules and 98 % of small molecules do not cross the BBB (Pardridge, 2005). Another important factor tuning the availability of substances in the CNS is the involvement of active and efflux transporters (Schinkel et al., 1996). Efflux transporters spit their substrates back into the circulation and prevent them from reaching the brain (Demeule et al., 2002). It is estimated that up to 60 % of currently marketed drugs are substrates for ATP-binding cassette (ABC) transporters (Hersh et al., 2016). The most well-known member of the ABC family is P-glycoprotein (P-gp), also known as ABCB1, which helps the brain avoid potentially toxic substances.

Several studies have been conducted to investigate whether P-gp is responsible for the low concentration of oxime reactivators (2-PAM and HI-6) in the brain. Interaction of 2-PAM with P-gp was investigated through transwell permeability in Madin-Darby canine kidney (MDCKII) and stem cell-derived human brain microvascular endothelial (BCI-hBMEC) cell lines. Simultaneously, the direct effect of transcellular transport on enzyme reactivation was investigated by modification of the transwell assay by adding paraoxon-inhibited AChE into the basolateral chamber. 2-PAM showed poor passage through the cell monolayer, and there was no observed influence of P-gp on either transcellular transport or enzyme reactivation (Gallagher et al., 2016). In another, breakthrough *in vivo*, study by Joosen et al., the P-gp inhibitor tariquidar was used in combination with HI-6, and it was shown that there was twice the level of HI-6 in the rat brain in comparison with HI-6 alone (Joosen et al., 2011). A follow-up study in rats also showed that after pre-treatment with tariquidar, there was a higher therapeutic efficacy of an HI-6 and atropine combination against soman-induced seizures. However, it has not been demonstrated whether this is due to the inhibitory effect of tariquidar on HI-6 or atropine, which has been also shown to interact with P-gp in the MDCK model (Joosen et al., 2016). Tentatively, there may be a neuroprotective contribution by tariquidar to the therapeutic efficacy of HI-6 in rats (Joosen et al., 2011; Gallagher et al., 2016; Joosen et al., 2016).

In summary, there is no clear proof whether the reactivators are P-gp substrates or not. In addition, no study has been carried out on the possible interaction of all the standard reactivators with P-gp.

The aim of our study is to investigate the interaction of standard oxime reactivators with P-gp, and whether such interaction may play a significant role in brain penetration. To this end, *in vitro* bidirectional transport studies were conducted in the CACO-2 cell line model, which has been reported to stably express human P-gp (Natoli et al., 2012).

2. Materials and method

2.1. Cell culture

Human epithelial colorectal adenocarcinoma (CACO-2) cells were purchased from ATCC (ATCC® HTB-37™). The cell line was maintained in EMEM (ATCC® 30-2003™) medium supplemented with 20 % heat-inactivated fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, F0804) and 5 % penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, A5955). Cells were seeded in 75 cm² tissue cell culture flasks (TPP, 90075) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. The medium was renewed every 2 or 3 days. Cells were split twice a week at 1:6 after using trypsin-EDTA solution (0.25 %, Sigma, T4049) for dissociation.

2.2. Transport experiments

For transport experiments cells were seeded at a density of 270 000 cells × cm⁻² on a collagen-coated (EMD Millipore, 08–115) transwell polyester membrane (Sigma-Aldrich, CLS 3460) and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. The growth medium was changed 3 h after seeding and then every 2–3 day in apical (0,5 ml) and basolateral (1,5 ml) compartments. The cells were used approximately 21 days post-seeding when the monolayer reached confluency and the expression of transporters is said to be most extensive (Natoli et al., 2012). To monitor the confluency of the monolayer the transepithelial electrical resistance (TEER) was measured throughout the 21 days using commercial apparatus (Millicell ERS-2, Merck) (Tavelin et al., 2002).

Five oxime reactivators obidoxime, pralidoxime, methoxime, trimedoxime and HI-6 (synthesized at the Department of Toxicology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Czech Republic) were tested in both directions: apical to basolateral (AB) and basolateral to apical (BA), with and without the P-gp inhibitor verapamil (Sigma-Aldrich, V4629).

Transport experiments were conducted by washing the cell monolayer with PBS (Sigma, D8537) and incubation in transport buffer (OptiMEM, Gibco 11058-21) for 30 min with or without inhibitor (Tavelin et al., 2002). For testing permeability of the monolayer, propranolol (Sigma-Aldrich, P0884) and lucifer yellow (LY) (Sigma-Aldrich, L0144) were used in 100 μM and 20 μM concentration, respectively. All the tested oximes were dissolved in transport buffer to a final concentration of 100 μM, which has been reported not to show cytotoxic effect (Soukup et al., 2018). 750 μl of the donor solution was added to the donor compartment (in the case of AB into the upper compartment, and for BA into the lower compartment), and the same volume of transport buffer was added into the acceptor compartment. The concentration of the drug in both compartments was measured by UV-VIS spectrophotometry (BioTek, Synergy HT) at 30, 60, 120 and 240 min of incubation. The absorbance data are reported in Supplementary materials (Fig. S2 and Fig. S3). In each experiment rhodamine 123 (R123, Sigma, R8004), a P-gp substrate, was included at 5 μM concentration as the control, with and without the presence of the inhibitor verapamil (15 μM). The tightness of the monolayer was assessed by the permeability of fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma, FD105) at 0.4 mg × ml⁻¹ at the end of each experiment.

2.3. Data analysis

The final TEER values are expressed as Ω × cm² based on the following equation:

$$\text{TEER} (\Omega \times \text{cm}^2) = (R_{\text{MONOLAYER}} - R_{\text{EMPTY FILTER}}) \times A$$

where $R_{\text{MONOLAYER}}$ and $R_{\text{EMPTY FILTER}}$ are the resistance of the filter insert with and without cells respectively, and A is the growth area in cm².

The apparent permeability coefficient P_{app} (cm × s⁻¹) was calculated as follows:

$$P_{\text{app}} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \frac{V_r}{(A \times C_0)}$$

where dQ/dt is the rate of appearance in the receiver compartment, V_r is the volume of the receiver compartment, C_0 is initial concentration, and A is the growth area (Tavelin et al., 2002).

The transport ratio (TR) for drug permeability in the BA and AB directions was calculated as follows:

$$\text{TR} = P_{\text{app}} (\text{BA}) / P_{\text{app}} (\text{AB})$$

It is assumed that $\text{TR} \geq 2$ is an indication for P-gp substrates, and TR between 1.5 and 2 is considered as inconclusive (Pollí et al., 2001; Zhang et al., 2006). After incubation with inhibitor, TR should drop to

at least 50 % to confirm the P-gp substrate.

Statistical analysis in CACO-2 transport assays was performed using one-way ANOVA. The Sidak multiple comparisons test was used to determine the significance of the difference between TR with/without inhibitor. The data were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software.

3. Results and discussion

The inhibition of P-gp is one approach that has been tested for better central availability of oxime reactivators. It builds on the fact that reactivators may be substrates of P-gp. Recently, Joosen et al. observed better therapeutic efficacy of HI-6 in combination with tariquidar and atropine in a soman-poisoned rat model. However, direct interaction of HI-6 with P-gp has not been proved (Joosen et al., 2016). From this study, and also from the study by Gallagher (Gallagher et al., 2016), the interaction of HI-6 and pralidoxime respectively with P-gp was shown as improbable. Furthermore, dependency of reactivation efficacy on the P-gp affinity has been investigated, however, a low predictability of P-gp affinity towards reactivation efficacy was shown. Pgp binding appears to be predictive for some oxime, but not exclusionary for all, to clinical efficacy of the entire class of oximes (Dail et al., 2019).

In our study we have used the CACO-2 cell model for investigation of whether P-gp influences the permeation of standard oxime reactivators into the brain. The CACO-2 cell model was chosen for its favorable features and high expression of human P-gp (Natoli et al., 2012). It stably expresses human P-gp in a polarized direction when cultured on an appropriate transwell support. P-gp substrates have lower permeability in the AB direction than in the BA direction due to an efflux effect of P-gp at the apical membrane (Tavelin et al., 2002). The control of monolayer confluency during differentiation has been provided by measuring TEER (see Supplementary materials Fig. S1). TEER values increased steadily to their maximum at day 18, with no further increase in TEER values between day 18 and day 21. The average TEER at day 20 was higher than $600 \Omega \times \text{cm}^2$ in all the experiments. The control of monolayer integrity was conducted by FITC test after each experiment. The accepted values of FITC in the acceptor compartment after 60 min incubation must not exceed 1 % of initial donor concentration (Reznicek et al., 2017).

First of all, to check the monolayer permeability, propranolol (100 μM) as a high permeability marker and lucifer yellow (20 μM) as a low permeability marker were used. The values of Papp for propranolol were 22.55×10^{-6} and for LY 0.07×10^{-6} , which correspond to published data (Xw et al., 2007; Zhao et al., 2019). Next, R123, a known substrate of P-gp, was used as a reference P-gp substrate to assess the functional activity of P-gp in cell assays (Lee et al., 1994). An initial transport experiment for R123 (in 5 μM) indicated that R123 is a substrate of P-gp. Papp in the BA direction being more than double that in the AB direction for CACO-2 cells (TR = 4.56). The transport experiment was repeated in the presence of the inhibitor verapamil (at 15 μM concentration) to abolish P-gp mediated efflux. Co-incubation with verapamil attenuated the efflux effect and the TR dropped to 1.76. Thus, the Papp was approximately equalized in both directions (AB and

Table 1

The values of Papp ($\times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$) for each oxime reactivator and the standard rhodamine 123 (R123) in both directions with/without the P-gp inhibitor verapamil. Data expressed as the mean \pm S.D., n = 3.

	AB	BA	AB + I	BA + I
Pralidoxime	0.82 \pm 0.49	0.79 \pm 0.37	1.52 \pm 1.02	0.95 \pm 0.85
Obidoxime	0.40 \pm 0.13	0.22 \pm 0.28	0.26 \pm 0.33	0.11 \pm 0.13
Trimedoxime	1.02 \pm 0.91	0.29 \pm 0.31	0.28 \pm 0.38	0.28 \pm 0.38
Methoxime	0.90 \pm 1.24	0.16 \pm 0.22	0.09 \pm 0.13	0.07 \pm 0.10
HI-6	0.47 \pm 0.32	0.76 \pm 0.61	0.54 \pm 0.64	0.24 \pm 0.08
R123	0.88 \pm 0.08	4.50 \pm 2.16	0.34 \pm 0.35	0.43 \pm 0.30

BA) by the inhibitor (Fig. 1).

The transport of all oxime reactivators showed a similar pattern (Table 1). The values of Papp in both directions AB and BA indicated a low ability in general to penetrate through the CACO-2 monolayer. The values of AB transport are close to that for LY, the marker of low permeability. This is not surprising, as positively charged hydrophilic compounds penetrate barely through barriers in the organism. Equivalently, the low Papp in the BA direction indicated that the efflux transporter has no influence on the transport of test substances. The difference in penetration in directions AB and BA is expressed as the TR. The TR of all reactivators tested did not exceed 2.0, which is the threshold for a possible effect of P-gp on the permeation of a test substance. Furthermore, co-incubation with the P-gp inhibitor verapamil did not cause any significant changes in the transport of oximes in either the AB or BA direction, in contrast to the significant changes for the model P-gp substrate R123 (Fig. 2).

4. Conclusion

To sum up, an interaction between P-gp and standard oxime reactivators has been denied in the CACO-2 model. In relation to the overall amount that passed through the CACO-2 monolayer, there is a question as to whether P-gp could even play any important role, as only a small number of molecules could enter the membrane due to the effect of their charged nitrogen. Taken together, human P-gp had no essential effect on the permeability of standard reactivators in the CACO-2 model. Hence the overall insufficient availability of reactivators in the CNS is mainly due to their physicochemical properties, which prevent them from passing through the lipophilic blood-brain barrier, and not to the interaction with P-gp. Thus, therapeutic approaches targeting the deactivation of P-gp do not seem to be a promising way of increasing the availability of standard oximes in the brain. On the other hand, P-gp inhibitors may enhance protection by e.g. the effect on other drugs like atropine, as was shown previously.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

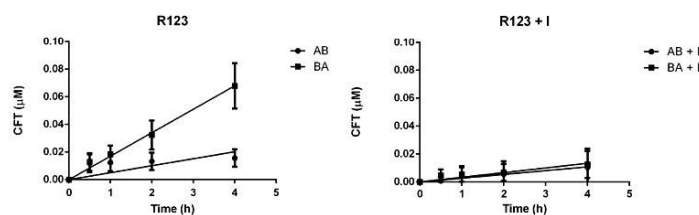


Fig. 1. Cumulative fraction transported across epithelial membrane over time (in μM) for R123. After incubation with the P-gp inhibitor verapamil (I) the difference between BA and AB direction was almost eliminated.

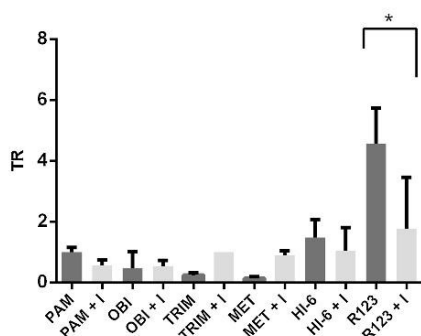


Fig. 2. The values of transport ratio (TR) of tested oxime reactivators (PAM = pralidoxime, OBI = obidoxime, TRIM = trimedoxime, MET = methoxime) at 100 μ M and of Rhodamine 123 (R123) at 5 μ M in the presence or absence of inhibitor verapamil (I) at 15 μ M. Data are presented as the mean \pm S.D., $n = 3$. Using ANOVA test and Sidak's multiple comparisons test a significant difference between TR with/ without inhibitor was observed only for R123. Level of significance: * $p \leq 0.05$. Values of TR ≥ 2 indicate the drug to be a P-gp substrate.

Acknowledgements

This work was supported by the grant of Grant Agency of the Ministry of Health Czech Republic no. 17-32801A and student project no. SV/FVZ201708.

The authors are grateful to Ian McColl M.D., PhD. for assistance with the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152541>.

References

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>.
- Antonijevic, B., Stefanovic, D., Milovanovic, Z.A., et al., 2002. Standard antidotes along with sodium bicarbonate in organophosphate poisoning. In: Proceedings of Chemical and Biological Medical Treatment Symposium (CBMTS). Spiez, Switzerland.
- Bajgar, J., 2004. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 151–216.
- Dail, M.B., Meek, E.C., Chambers, H.W., Chambers, J.E., 2019. In vitro P-glycoprotein

- activity does not completely explain in vivo efficacy of novel centrally effective oxime acetylcholinesterase reactivators. *Drug Chem. Toxicol.* 42, 403–408. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1461902>.
- Daneman, R., Prat, A., 2015. The Blood-Brain Barrier. *Gold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023412>.
- Demeulle, M., Régina, A., Jodoin, J., et al., 2002. Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascul. Pharmacol.* 38, 339–348. [https://doi.org/10.1016/s1537-1891\(02\)00201-x](https://doi.org/10.1016/s1537-1891(02)00201-x).
- Gallagher, E., Minn, I., Chambers, J.E., Searson, P.C., 2016. In vitro characterization of pralidoxime transport and acetylcholinesterase reactivation across MDCK cells and stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells (BC1-hBMECs). *Fluids Barriers CNS* 13 (10).
- Hersh, D.S., Wadajkar, A.S., Roberts, N., et al., 2016. Evolving drug delivery strategies to overcome the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 22, 1177–1193.
- Joosen, M.J.A., van der Schans, M.J., van Dijk, C.G.M., et al., 2011. Increasing oxime efficacy by blood-brain barrier modulation. *Toxicol. Lett.* 206, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.231>.
- Joosen, M.J.A., Vester, S.M., Hamelink, J., et al., 2016. Increasing nerve agent treatment efficacy by P-glycoprotein inhibition. *Chem. Biol. Interact.* 259, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.012>.
- Korabecny, J., Soukup, O., Dolezal, R., et al., 2014. From pyridinium-based to centrally active acetylcholinesterase reactivators. *Mini Rev. Med. Chem.* 14, 215–221.
- Lee, J.S., Paull, K., Alvarez, M., et al., 1994. Rhodamine efflux patterns predict P-glycoprotein substrates in the National Cancer Institute drug screen. *Mol. Pharmacol.* 46, 627–638.
- Lorke, D.E., Kalasz, H., Petroianu, G.A., Tekes, K., 2008. Entry of oximes into the brain: a review. *Curr. Med. Chem.* 15, 743–753.
- Mercey, G., Verdelet, T., Renou, J., et al., 2012. Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Acc. Chem. Res.* 45, 756–766. <https://doi.org/10.1021/ar2002864>.
- Natoli, M., Leoni, B.D., D'Agnano, I., et al., 2012. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 26, 1243–1246. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.03.009>.
- Pardridge, W.M., 2005. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRX* 2, 3–14. <https://doi.org/10.1602/neuroRx.2.1.3>.
- Poll, J.W., Wring, S.A., Humphreys, J.E., et al., 2001. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 620–628.
- Reznicek, J., Ceckova, M., Ptackova, Z., et al., 2017. MDR1 and BCRP transporter-mediated drug-drug interaction between Rilpivirine and abacavir and effect on intestinal absorption. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00837–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00837-17>. /aac/61/9/e00837-17.atom.
- Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Mol, C.A., van Deemter, L., 1996. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.* 97, 2517–2524. <https://doi.org/10.1172/JCI118699>.
- Soukup, O., Korabecny, J., Malinak, D., et al., 2018. In vitro and in silico evaluation of non-quaternary reactivators of AChE as antidotes of organophosphorus poisoning - a new hope or a blind alley? *Med. Chem. Shariqah United Arab Emir.* 14, 281–292. <https://doi.org/10.2174/1573406414666180112105657>.
- Tavelin, S., Gråsjö, J., Taipalensuu, J., et al., 2002. Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport. *Methods Mol. Biol. Clifton N. J.* 188, 233–272. <https://doi.org/10.1385/1-59259-185-X:233>.
- Xu, Y., Xu, Y., Wang, Y., et al., 2007. Establishment of Caco-2 cell monolayer model and standard operation procedure for assessing intestinal absorption of chemical components of traditional Chinese medicine. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 5, 634–641. <https://doi.org/10.3736/jcim20070607>.
- Zhang, L., Strong, J.M., Qiu, W., et al., 2006. Scientific perspectives on drug transporters and their role in drug interactions. *Mol. Pharm.* 3, 62–69. <https://doi.org/10.1021/mp05095h>.
- Zhao, W., Han, L., Bae, Y., Manickam, D.S., 2019. Lucifer yellow - a robust paracellular permeability marker in a cell model of the human blood-brain barrier. *J. Vis. Exp. JoVE*. <https://doi.org/10.3791/58900>.

Publikace 1Publikace 2

Kobřilová T., Korábečný J., Soukup O.: Current approaches to enhancing oxime reactivator delivery into the brain. *Toxicology*, 423, 2019:75-83.

Míra zapojení autora dizertační práce:

- vlastní text publikace
- tvorba a zpracování obrazových příloh



Review

Current approaches to enhancing oxime reactivator delivery into the brain

Tereza Koblrova^{a,b}, Jan Korabecny^{a,b}, Ondrej Soukup^{a,b,*}^a Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01, Hradec Kralove, Czech Republic^b Biomedical Research Centre, University Hospital, Sokolska 581, 500 05, Hradec Kralove, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Reactivator
Oxime
Blood brain barrier
Organophosphate
Antidote

ABSTRACT

The misuse of organophosphate compounds still represents a current threat worldwide. Treatment of poisoning with organophosphates (OPs) remains unsatisfactorily resolved despite the extensive investment in research in academia. There are no universal, effective and centrally-active acetylcholinesterase (AChE) reactivators to countermeasure OP intoxication. One major obstacle is to overcome the blood-brain barrier (BBB). The central compartment is readily accessible by the OPs which are lipophilic bullets that can easily cross the BBB, whereas first-line therapeutics, namely oxime-based AChE reactivators and atropine, do not cross or do so rather slowly. The limitation of oxime-based AChE reactivators can be ascribed to their chemical nature, bearing a positive charge which is essential either for their AChE affinity or their reactivating potency. The aim of this article is to review the methods for targeting the brain by oxime reactivators that have been developed so far. Approaches using prodrugs, lipophilicity enhancement, or sugar-based oximes have been rather unsuccessful. However, other strategies have been more promising, such as the use of nanoparticles or co-administration of the reactivator with efflux transporter inhibitors. Encouraging results have also been associated with intranasal delivery, but research in this field is still at the beginning. Further research of auspicious approaches is inevitable.

1. Introduction

Organophosphates (OPs) are synthetic derivatives of phosphoric and phosphonic acids (Bajgar, 2004). They have a number of applications in human society but are most commonly used as pesticides in agriculture around the world (King and Aaron, 2015). OP pesticides have been used because of their low environmental stability and high insecticidal effectivity/toxicity, in comparison with for example, organochlorines such as DDT (Casida and Quistad, 1998). However, there have been many cases of suicidal or unintentional pesticide poisonings, a consequence of their widespread availability. Pesticides are known to be responsible for thousands of deaths every year (Gunnell et al., 2007).

The militarized and highly toxic OPs, the so-called nerve agents (NAs), are chemical warfare agents. The first described NA, tabun, was discovered during research into the development of new OP insecticides by German chemist Gerhard Schrader in the 1930s (Holmstedt, 1963). Subsequently, a series of NAs known as G-agents (sarin and soman) was developed by the Germans in the 1940s. After intense research on OPs launched after WWII, many compounds were developed to be used as pesticides and, regrettably, also highly toxic OPs were developed as chemical warfare agents (e.g. VX agent) (Ghosh and Newman, 1955). Later, a group of super-toxic agents called Novichok was developed by

the Russians (Zoltani, 2009). Novichok agents were almost unknown until recently, when it seems that a member of this group was used for assassination purposes in Great Britain. These agents are thought to be extremely toxic and stable in the environment, and undetectable by standard detection tools. They are designed to be deployed as a binary mixture when the lethal agent arises from the precursors after mixing.

From a historical point of view, OPs have been misused in several conflicts. In the 1980s the NAs were used in the Iran-Iraq war against Iranian troops and the Kurdish population in Northern Iraq (Riley, 2003). Later, in 1995 sarin was released by a Japanese cult in a residential area in Matsumoto, and against civilians in the Tokyo subway. It resulted in thousands of injuries and dozens of deaths (Yanagisawa et al., 1995; Nagao et al., 1997). During the Syrian civil war in 2013, a sarin attack killed more than 1400 people (King and Aaron, 2015). Recently, in February 2017, the half-brother of North Korea's leader, Kim Jong-nam was killed by highly toxic VX. The large amount of stockpile and huge number of victims resulting from homicidal use of these agents led to establishment of the Chemical Weapons Convention (King and Aaron, 2015; Worek et al., 2016a,b) in 1997, prohibiting the storage, use and development of chemical weapons. Most countries have signed this agreement, although some have not, e.g. Palestine, North Korea, Egypt, Sudan. Despite the CWC, NAs still represent a big

* Corresponding author at: Biomedical Research Centre, University Hospital, Sokolska 581, 500 05, Hradec Kralove, Czech Republic.

E-mail addresses: koblrova.tereza@gmail.com (T. Koblrova), korabecny.jan1@gmail.com (J. Korabecny), ondrej.soukup@fnhk.cz (O. Soukup).<https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.05.006>

Received 21 February 2019; Received in revised form 17 April 2019; Accepted 13 May 2019

Available online 18 May 2019

0300-483X/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

threat, and there is danger in using them in both civilian and military settings (King and Aaron, 2015; Worek et al., 2016a).

2. OP mechanism of action

OPs are compounds affecting cholinergic neurotransmission. Due to their inhibitory effect on acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7), the enzyme which degrades the neurotransmitter acetylcholine (ACh) at neuronal synapses and neuromuscular junctions, OPs create acute cholinergic crisis manifesting with muscarinic, nicotinic and central symptoms. The effect of NAs is long-lasting, and depends on the time and route of exposure. After the acute crisis, chronic toxicity may occur due to neurological damage (Sidell, 1974; Abou-Donia, 1981).

The active site of AChE consists of three amino acid residues, namely serine-histidine-glutamate, known as the catalytic triad of the enzyme. Under physiological conditions AChE catalyzes the hydrolysis of ACh. The nucleophilic serine binds ACh and splits it into acyl-serine and choline. A histidine-activated water molecule then hydrolyses the acyl-serine by nucleophilic attack to acetate and free enzyme (Quinn, 1987). The first step of the OP mechanism of action is the irreversible phosphorylation of the active site of AChE. The mechanism of action of OPs (Fig. 1) somewhat mimics the initial step of ACh hydrolysis. The OP enters the active site and covalently binds to the serine hydroxyl group. The spontaneous hydrolysis of the phosphyl-enzyme is extremely slow (from hours to days). However, the hydrolysis process can be facilitated by reactivators (Masson and Lockridge, 2010; Mercey et al., 2012b). If no spontaneous facilitated hydrolysis occurs, the enzyme-OP complex may dealkylate and thereby be further stabilized. Such process is called “aging”. Reactivation of the enzyme is possible until the “aged” conjugate is formed. Aging usually involves dealkylation of the alkoxy group on the phosphorus atom, and formation of a salt bridge between phosphonic anion and protonated histidine (Masson and Lockridge, 2010). The speed of formation of aged conjugates depends on the structural features of each OP (from minutes to dozens of hours) (Worek et al., 2004). When the AChE is inhibited, overstimulation of cholinergic receptors occurs and subsequently, the acute symptoms are manifested (Maxwell et al., 2006).

Clinical manifestations can be divided by the site of action and latency time. The acute intoxication of OPs escalates parasympathetic activity via muscarinic receptors, resulting in the mnemonic SLUDGE syndrome (salivation, lacrimation, urination, defecation, gastric secretion and emesis) and miosis. Such syndrome is not life threatening but the rising bronchorrhea and bradycardia can result in pulmonary edema (Lee and Tai, 2001; Rusyniak and Nañagas, 2004). Excessive nicotinic receptor stimulation at the neuromuscular junction causes muscle fasciculation, cramping, weakness and/or paralysis (Wadia et al., 1974). Paralysis of the breathing muscles may, in combination with bronchoconstriction and central breathing depression, ultimately lead to death by suffocation. The effect on the CNS occurs in the acute

phase due to excessive nicotinic and muscarinic receptor stimulation in the brain, and includes anxiety, restlessness, confusion, seizures and coma. Other clinical effects are hyperglycemia (Meller et al., 1981), metabolic acidosis, pancreatitis (Hsiao et al., 1996) and QT prolongation (Nogue et al., 2003). An intermediate syndrome (a myasthenia-like syndrome) can occur 1–3 days after intoxication and involves muscle weakness and may cause delayed respiratory failure (Senanayake and Karalliedde, 1987; Sungur and Güven, 2001; John et al., 2003). This syndrome is also well-documented for OP insecticide poisoning, albeit only in 30–40% cases of such poisoning manifest as intermediate syndrome (He et al., 1998). It has not been described for NAs, although some similar muscle changes have been observed after tabun, soman and sarin intoxication in experimental animals (Hughes et al., 1991). Late symptoms are mostly represented by OP-induced delayed polyneuropathy (OPIDN) via phosphorylation and aging of the neuropathy target esterase enzyme. OPIDN typically arises after higher dose exposure to G-agents (Johnson and Glynn, 1995). Symptoms of OPIDN manifest 1–4 weeks after intoxication and involve symmetrical weakness in the limbs with subsequent paralysis, muscle cramping and pain (Lotti et al., 1984). The long-term effect caused by neurotoxicity impacts on the neuropsychological state, and manifests as deficits in the areas of memory, concentration, problem solving and dexterity (Savage et al., 1988). There have been several studies describing the causes of late symptoms, including alkylation, oxidative stress, and neuronal cell death (Abou-Donia and Lapadula, 1990; Pazdernik et al., 2001). However, the exact mechanisms leading to these symptoms have not yet been fully understood.

3. Therapy

The standard therapy for OP poisoning consists of a combination of atropine, an oxime reactivator, and a benzodiazepine to simultaneously support the vital functions (Antonijvic et al., 2002).

When OP poisoning is expected, prophylactic measures may be taken. Such approach is based on the temporary block of AChE by reversible cholinesterase inhibitors, the administration of antidotes, or a combination of both (Bajjar, 2004). The mechanism of action is based on protection of the active site of AChE from phosphorylation by the OP agent. When a reversible inhibitor or pseudo-irreversible inhibitor binds the enzyme, part of the enzyme pool remains hidden from the phosphorylating agent during the acute phase of intoxication (Eckert et al., 2006, 2007). The use of carbamates (e.g. pyridostigmine bromide) has shown a prophylactic effect against intoxication, especially in combination with anticholinergics such as benactyzine or trihexyphenidyl for reduction of side effects and protection of the central compartment. Another possibility for prophylaxis is based on bioscavenger administration. A bioscavenger is an exogenous enzyme which neutralizes or binds the OP in the blood stream (Masson and Lockridge, 2010; Nachon et al., 2013). The catalytic bioscavengers cleave the

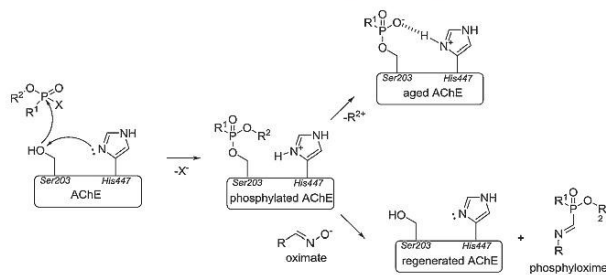


Fig. 1. Mechanism of AChE inhibition by nerve agent including the process of aging. The recovery of enzyme activity by oximate (oxime active form) is outlined below.

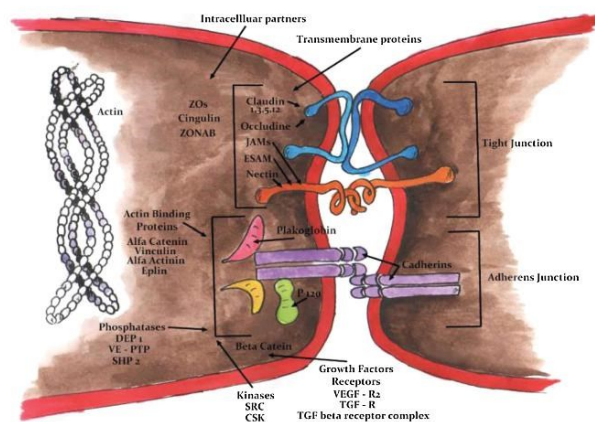


Fig. 2. The cerebral endothelial cells have two types of connection. Tight junctions (TJ) consist of three integral membrane proteins (claudin, occludin and junction adhesion molecules), together with cytoplasmic accessory proteins (zonula occludens (ZO), cingulin and others) which bind TJ to the actin, the primary cytoskeleton protein providing structural support to the ECs. Adherens junctions (AJ) form adhesive contact between cells. The most important protein is cadherin which connects the actin cytoskeleton via catenins (Ueno, 2007).

phosphorus-ester bond. Human paraoxonase (PON1) and bacterial phosphotriesterase (PTE) are typical representatives of such esterases (Masson and Lockridge, 2010). These enzymes are esterases capable of hydrolyzing the OP-enzyme complex repeatedly. On the other hand, stoichiometric bioscavengers (human AChE and BChE) are only able to bind NAs irreversibly in the stoichiometric 1:1 ratio. Their utility can be further improved by using them in combination with an oxime reactivator, thus restoring the native enzyme function and simultaneously ensuring repeated use of each molecule of the scavenger. The latter approach is called pseudo-catalytic bioscavenging (Kovarík et al., 2010; Worek et al., 2016b). The concept of bioscavengers in any form represents a huge potential in the therapy of OP intoxication, even as a post-exposure therapy (Rice et al., 2016; Mann et al., 2018). However, their introduction is still hampered by costly production, immunogenicity, interspecies diversity and the risk of infection (Trovaslet-Leroy et al., 2011). These problems could be solved by the production of BChE by isolation from transgenic plants (e.g. *Nicotiana benthamiana*) (Alkanaimsh et al., 2016).

Anticonvulsants are used for controlling the seizures as they reduce neural damage, and prevent respiratory failure and death (Dickson et al., 2003). The most common anticonvulsants are benzodiazepines, e.g. diazepam, and are considered as the first-line therapy of seizures induced by OPs. Besides protecting against brain damage, they relieve agitation and/or anxiety in the victim (Marrs, 1993).

The only causal antidotes of OP poisoning are the oxime reactivators. On the other hand, symptomatic relief can be achieved only via administration of anticholinergics. Anticholinergics are drugs which antagonize the effect of accumulated ACh at the cholinergic synapses and neuromuscular junctions. Atropine is the most commonly used drug in the treatment of human poisoning and it has been the foundation of antidotal treatment since the 1950s (Eddleston and Chowdhury, 2016). It has an effect mostly on the muscarinic receptors, thereby restoring cardiopulmonary function. Nevertheless, it offers no protection from nicotinic symptoms. Furthermore, atropine crosses the blood-brain barrier (BBB) slowly and therefore the ability to protect the brain from the fast and deleterious action of NAs is limited (Ketchum et al., 1973). Although other anticholinergics, such as scopolamine, benactyzine and biperiden, effective on the CNS, are available, they are not widely used in practice (Kassa, 2002).

As previously mentioned, causal treatment is represented by the *cholinesterase reactivators*. Typical of this group are the oxime-based reactivators. The oxime moiety acts as a nucleophile that attacks the electron-deficient phosphorus atom irreversibly bound to the active site

of the serine hydroxyl residue. Inhibited AChE reactivates spontaneously, but extremely slowly (Eddleston et al., 2008). Oximes speed up this process. Currently, pralidoxime and obidoxime are used clinically, whereas trimedoxime, methoxime, and asoxime (HI-6), are used in the field conditions and are country-specific. However, several drawbacks are still associated with oxime therapy: 1) They reactivate AChE mostly in the peripheral tissue, as their permanent positive charge restrains them from crossing the BBB. 2) There is no broad-spectrum reactivator suitable for the whole range of OPs, since the different architectures of the various OP-AChE complexes are not vulnerable to a single universal antidote (Shih et al., 2012; Mercey et al., 2012b; Korabecny et al., 2014). 3) The aged AChE-inhibitor complex cannot be reactivated by oximes. 4) The use of some oximes is limited by the rebound phenomenon, i.e. re-inhibition of AChE by phosphorylated oxime (Maxwell et al., 2013). Hence the current research in the field is focused on the search for a reactivator with the most versatile if not universal application, and which is highly effective and centrally available. The reported spectrum of efficacy of individual marketed oxime reactivators is often hampered by differences in AChE species, experimental conditions and protocols used by different labs. The spectrum of efficacy of oxime reactivators is beyond the scope of this review and the readers are kindly referred elsewhere, e.g. (Kassa, 2002; Worek et al., 2002).

4. The BBB morphology and physiology and methods for evaluation of oxime penetration through it

The central compartment is endangered by organophosphates because their lipophilic nature enables them to cross the BBB readily, whereas oxime reactivators do not cross or do so slowly.

The brain (extracellular fluid in the brain) and the blood are separated by barriers which protect the brain from xenobiotics. Specifically, there are two barriers 1) BBB, and 2) blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier followed by the CSF-brain interface. The most important is the BBB which separates the blood in the brain capillaries from the brain parenchyma. The BBB (Fig. 2) has a dual function, acting as a prophylactic barrier but also possessing a carrier function. It is formed by a line of endothelial cells adjacent to basal lamina. This line fits tightly to the perivascular pericytes and astrocytes. Endothelial cells in the brain differ from those found in most other organs in two important ways: I) In most of the body's vessels transcellular transport is very non-specific and mediated by receptors; and II) body vessels have fenestrations, so that passive diffusion of low molecular-weight substances can proceed via a paracellular path between two neighboring cells. In contrast, the

endothelial cells in the brain create tight junctions (TJ), the absence of fenestrations avoids paracellular transport, and the transcellular transport is mediated by specific transporters and is very limited. The cells also contain a high number of mitochondria providing high metabolic activity. Because of the presence of the TJ, the only pathway through the BBB is by transcellular passage through the two membranes via passive diffusion or transporter-mediated crossing. The phospholipid membrane is typically permeable for small lipophilic and gaseous molecules. The molecular weight and degree of ionization are crucial factors for crossing (Abbott et al., 2006; Wilhelm et al., 2014). Small ions get into the brain poorly because of high transendothelial resistance in the brain endothelium. Therefore, it is obvious that permanently-charged and hydrophilic molecules such as oximes barely cross the BBB and are unable to reach a therapeutically relevant concentration (Lorke et al., 2008).

It has been reported that the currently-used oximes can penetrate the BBB, but only about 4–10% of the plasma level, and this is unlikely to be sufficient to protect the brain against OPs (Lorke et al., 2008). Others have reported even less permeation, in a range of 0–3% (Žďárová Karasová et al., 2014).

To enhance the distribution of oxime reactivators to the central compartment, different strategies have been investigated and are summarized here.

5. General approaches to overcome the blood-brain barrier

Since 90% of small and 100% of large molecules cannot get into the brain, overcoming or bypassing the BBB is one of the major goals for drugs targeting the CNS (Pardridge, 2005). Accordingly, many approaches have been put forward, but none of them is fully versatile and applicable for every case. Some of the emerged strategies mentioned below (Fig. 3) seem promising, but further research is still needed.

Osmotic, chemical and other types of BBB disruption are all strategies to enhance paracellular transport. Osmotic agents (e.g. mannitol) cause widening of the TJs and thus enable paracellular transport into the brain (Rapoport and Robinson, 1986). However, this approach has serious side effects resulting in brain edema, with neurotoxic components entering from the blood to the brain (Nadal et al., 1995). Chemical disruption of the BBB by vasoactive agents (e.g. alkylglycerols, bradykinin) induces temporary inflammation in endothelial cells and thus opens the BBB for a certain time (Lee et al., 2002). However, there

is also the risk of infiltration of undesirable toxic substances to the brain. One unique delivery approach used focused ultrasound to disrupt the BBB to enable drug passage, but this method requires highly sophisticated instrumentation and software (Sheikov et al., 2008). Cell-based drug delivery has not yet been tested for oximes. In this approach, immune cells migrate into the CNS via an inflammation-mediated pathway. They cross the BBB by diapedesis into the sites of inflammation and the attached drug passes along these cells. The main drawbacks are toxicity of the cargo to the cell carrier, and controlling the uptake and release of the drug to achieve a therapeutic concentration (Zhang et al., 2015). This approach is in contrast with the nature of antidotes which need timely administration, sometimes under field conditions, from an autoinjector.

So far, the most promising trend for getting oximes to the brain is by enhancing transcellular transport, and includes the use of prodrugs, increasing lipophilicity, or by using receptor-mediated transcytosis. Receptor-mediated transcytosis plays an essential role by using nanoparticles or glucose modification of oximes described below. Bypassing the BBB altogether is also a way that should be given attention, and below we describe intranasal delivery, and also convection-enhanced delivery (CED) and microchips.

5.1. The use of nanoparticles

One of the recent modern strategies for transportation of a drug into the brain is by using nanoparticles (NPs). Their small size allows a wide application in medicine and biology. Current research trends in this field lead to sensing, imaging and characterization of biological processes in cells as well as drug delivery; for review see e.g. (Wang and Wang, 2014). The use of nanocarriers enhances the transport of a drug into the brain, may protect the drug against enzymatic degradation, and enables slow release of the drug. NPs can be of natural or synthetic origin, and the size of NPs does not exceed 1000 nm. Although natural NPs show lower toxicity than synthetic ones, the natural NPs are hampered by fast biodegradation, batch-to-batch variability, and poor tracking capacity. The synthetics are not so quickly degraded, and on the contrary, may cause some toxicity or may aggregate in the blood (Kreuter et al., 1995). How do the nanocarriers reach the target area in the brain? In general, after intravenous administration the particles migrate in the blood stream and then through the BBB by a variety of examples of endocytosis (Saraiva et al., 2016). The passage mechanism

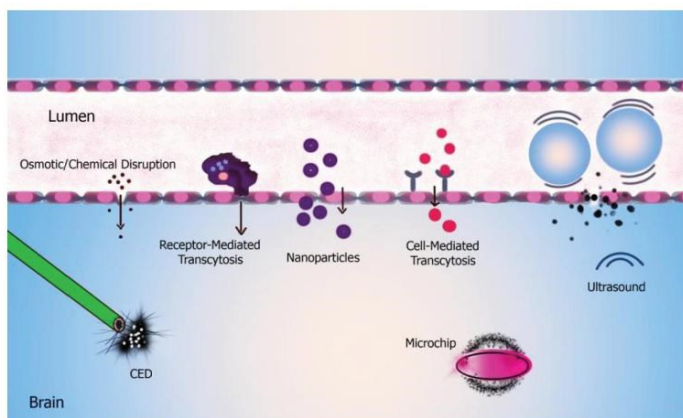


Fig. 3. Some strategies for overcoming the BBB. Enhancement of paracellular transport includes osmotic, chemical and ultrasound disruption. Transcellular crossing can be augmented by way of receptor-mediated transcytosis, nanoparticle formulation, or a cell-mediated way to overcome the membrane (Hersh et al., 2016).

across the BBB depends on the physicochemical properties of nano-carriers and the nature of the ligands which have been conjugated to the NPs to ensure BBB penetration. There are ligands mediating absorption (apolipoproteins), or directly interacting with a receptor or transporter (transferrin) in the BBB; ligands can reduce charge and increase hydrophobicity (amphiphilic peptides), or improve blood circulating time (polyethylene glycol, PEG) (Guerrero et al., 2010; Liu et al., 2013). The final destination of almost all NPs is the endolysosomal system where the drugs are released from the NPs.

HSA (human serum albumin) NPs are well tolerated and exert only marginal or no side effects. Modifications of HSA NPs can lead to specific receptor-mediated uptake. In the field of oxime reactivators, the transport of HI-6 bound on HSA NPs has been tested. The HI-6-loaded NPs were well transported through the endothelial cell model and the reactivation of brain AChE was two times higher than for free HI-6. Furthermore, the HSA NPs carrying HI-6 were reported to have an improved shelf life when freeze-dried, retaining the high effectiveness of the oxime (Dadparvar et al., 2011, 2014). Another study described an enhanced transport of HI-6 salts and obidoxime, both bound on HSA NPs, on a primary porcine brain capillary endothelial cell (pBCEC) model. In this case, the reactivation of OP-inhibited AChE was higher than for free oximes (Wagner et al., 2010).

The mechanism of the NP-drug transport through the BBB has not been sufficiently elucidated so far. However, it has been hypothesized that shortly after administration of the HSA NP conjugates, the blood-stream apolipoproteins (Apo) are adsorbed on to the surface of the NPs, transferred by endocytosis to the endothelium, and subsequently recognized by the transport mechanism for lipoproteins and transported into the brain. Interestingly, two different modifications of HSA nanoparticles, ApoE-modified and PEGylated, have been prepared. The ApoE-modified have shown better BBB penetration, while the PEGylated have been found to be accumulated in the endothelial cells without reaching the brain (Wagner et al., 2012).

Solid lipid nanoparticles (SLNs) with encapsulated 2-PAM were used for the protection and postexposure treatment of paraoxon-poisoned rats. The same dose (5 mg/kg i.v.) of free 2-PAM and PAM-SLNs were applied 1 h after paraoxon (POX) intoxication ($0.8 \times LD_{50}$ of POX; 600 µg/kg, i.p.). Free 2-PAM cannot reactivate brain AChE but 2-PAM – SLNs reactivated 15% of brain AChE activity. In contrast to free 2-PAM, the elimination half-life was 6-fold higher in plasma, which may support better penetration to the brain. The level of encapsulated 2-PAM in the brain tissue was two times higher compared to the free fraction of 2-PAM. However, 2-PAM – SLNs had a concentration peak at 45 min which indicates the delayed penetration of quaternary oxime through the BBB. Because of the delayed penetration of encapsulated oxime into the brain, 2-PAM-loaded SLNs should be more effective as pretreatment of OP poisoning rather than post-exposure emergency treatment. Pre-treatment with 2-PAM-loaded SLNs 45 min before injection of $2 \times LD_{50}$ of POX prevented mortality in 50% rats, in contrast to 10% rats with free 2-PAM pretreatment. 2-PAM-loaded SLNs should be also very effective in delayed postexposure treatment for reactivation of AChE (Pashirova et al., 2017).

Yang and colleagues described NPs with a mesoporous silica core (MSNs) and a transferrin (TF) shell. The TF receptor is highly expressed on the BBB surface and it was proposed that TF-MSNs could cross the BBB by a receptor-mediated transport mechanism. With this premise in mind, HI-6 was conjugated with TF-MSNs. The study carried out in zebrafish and mice revealed rapid permeation through the BBB showing 20% of brain AChE recovery after intoxication by soman. This value is much higher than that found for HI-6 (~3%), which was only effective in the peripheral circulation (Yang et al., 2016).

The promising results are however hampered by several drawbacks and limitations of the NP-based drug delivery concept. The design and process of production are very expensive and complicated, the main issues being related to low drug-loading capacity, low loading efficiency, and poor ability to control the size of the NPs. Furthermore,

there are a large number of undesirable interactions of NPs in the body such as toxic and allergic reactions. Other limitations are the accumulation of particles associated with hampered elimination, or on the other hand their very rapid degradation (Wilczewska et al., 2012).

5.2. Inhibition of P-glycoprotein

This approach builds on the fact that some oxime reactivators are P-glycoprotein (Pgp) substrates. The Pgp, an active efflux transporter, is located at the luminal membrane of endothelial cells and its inhibition may be another approach to increase the brain level of oxime. One Pgp inhibition study on rats using tariquidar, a non-competitive inhibitor of Pgp, resulted in twice the level of HI-6 in the brain after 1 h compared to control rats. Interestingly, the plasma level of HI-6 remained the same in both groups (Joosen et al., 2011). Further, the soman-inhibited AChE showed double the activity in the rat brain pre-treated with tariquidar and a combination of HI-6 and atropine in comparison to rats pre-treated only with HI-6 and atropine. However, it is not clear whether the effect on the CNS in the presence of tariquidar was the result of an increase in the effect of atropine (it was found to be a substrate for Pgp too) or HI-6, or a combination of both (Joosen et al., 2016). It must be also mentioned that not all the reactivators are Pgp substrates. A study inspecting the penetration of 2-PAM through Madin-Darby canine kidney (MDCKII) cells, and stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells (BC1-hBMECs) expressing Pgp, claimed that 2-PAM is not a Pgp substrate (Gallagher et al., 2016). Thus, the co-application of 2-PAM with tariquidar will presumably have no effect on brain-AChE recovery.

5.3. Increasing the lipophilicity

Increasing a compound's lipophilicity is another possible route to improved penetration into the brain.

The synthesis of analogues of 2-PAM with a longer chain on the charged nitrogen instead of methyl to enhance lipophilicity led to compounds with improved penetration through the BBB. A penetration ratio of 30% was determined by *in vivo* rat microdialysis, but the reactivation efficacy was two times lower than that of the parent 2-PAM, and the usefulness of these compounds was further limited by their significant toxicity (Okuno et al., 2008).

The incorporation of a fluorine atom into the heterocyclic ring of pyridinium oximes led to increased lipophilicity and better penetration through the BBB. Membrane permeability measurements using the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) method showed that permeability positively correlates with the number of fluorine atoms. The value of log Pe for the bis-fluorinated oxime (-6.2) was better than that for the mono-fluorinated oxime (-6.7), and both values were better than for the standards propranolol (-5.1) and warfarin (-6.0) (Jeong et al., 2009).

The efficacy of fluorinated analogues of oxime K203 to reactivate tabun-inhibited AChE was compared to that of oxime K203, a structurally-suitable reactivator for replenishing AChE activity after tabun exposure. K203 itself possesses poor penetration into the brain, whereas it was estimated that its fluorinated analogue would have higher brain bioavailability and thus an improved reactivation profile. Unfortunately, neither the BBB penetration nor the reactivation efficacy was better than for K203 (Kassa et al., 2010).

Some other studies have described other lipophilic analogs of reactivators, such as phenoxyalkyl pyridinium oximes, which have a better reactivation potential in the CNS. *In vivo* tests on rats after sarin and VX surrogates administration displayed a higher reduction in seizures in comparison to 2-PAM (Chambers et al., 2016). However, in general, increasing lipophilicity and improved BBB permeability go hand-in-hand with higher neurotoxicity risk, poor solubility and off-targeting (Arnott and Planey, 2012; Voicu et al., 2016).

5.4. Sugar modification

Sugar-oxime conjugates could be potentially transported across the BBB by facilitative glucose transporters which can recognize the sugar. Specifically, transporter GLUT-1 is necessary for CNS functioning as it supplies the brain with D-glucose. This relatively non-specific transporter of hexoses is localized at both luminal (blood) and abluminal (brain) sides of the BBB (Cornford and Hyman, 2005). Bearing this in mind, conjugates of glucose or galactose with 2-PAM and TMB-4 were developed. The expected transport was partially confirmed in the study which demonstrated the attenuation of paraoxon-induced hypothermia in rats, indicating a central effect of sugar-oximes. A mechanism for this central effect was probably higher bioavailability, but transport by the glucose transporter was not confirmed (Rachaman et al., 1979; Heldman et al., 1986). These conjugates also showed less toxicity than the parent oximes. The reactivation activity achieved slightly lower values than 2-PAM in human AChE after POX, diisopropylfluorophosphate (DFP), and VX-inhibited AChE (Garcia et al., 2010). The compounds were ineffective in the case of tabun, sarin and soman AChE exposure. It should be pointed out that the potential of carrier transporters in facilitating brain transport would be limited, due to the fact that the presence of the sugar may result in many interactions with the host biological environment, such as erythrocytes and plasma components.

5.5. Prodrug

A prodrug method of transport into the brain has been described for 2-PAM, where an uncharged form, so-called pro-2-PAM, was synthesized to improve penetration through the BBB. After penetration, pro-2-PAM undergoes oxidation in the brain to produce active quaternary 2-PAM. Efficacy against DFP-exposed animals led to suppression and even elimination of seizures (Gordon et al. 2008). However, the ability to reduce the seizures after NA poisoning (sarin, VX and cyclosarin) in guinea pigs was not as high as expected. In the case of sarin and VX, pro-2-PAM was found to provide moderate reactivation of guinea pig cholinesterase in the CNS, whilst for cyclosarin it was completely inactive (Shih et al. 2011). Potential practical use is further complicated by difficult synthesis and low stability due to autooxidation (DeMar et al. 2010).

5.6. Uncharged reactivators

All the marketed reactivators are well-known charged pyridinium-based compounds, with very limited permeability through the BBB. A more recent hypothesis presumes that uncharged reactivators penetrate the BBB more easily. Pioneering work is related to neutral tertiary oximes MINA and DAM, which cross the BBB very well, but their reactivating potency was much lower than that of quaternary oximes. Moreover, higher doses led to toxicity, probably caused by the cyanide breakdown product of MINA (Askew, 1956; Shih et al., 2012).

The *AChE dual site binding strategy* is based on the ligand interaction with both anionic sub-sites of AChE, namely with the peripheral anionic site (PAS), where the so-called peripheral site ligand ensures anchoring of the reactivator, and with the catalytic anionic site (CAS), where the pyridinealdoxime is buried deep down ensuring reactivation (Mercey et al., 2011; Gorecki et al., 2016). Built upon this hypothesis, the very first study reported an uncharged reactivator consisting of phenyltetrahydroisoquinoline attached to pyridinealdoxime. Good reactivation potency was shown in several subsequent studies against tabun- and VX-inhibited AChE *in vitro* (Mercey et al., 2012a; Renou et al., 2013, 2014; Kliachyna et al., 2014), but *in vivo* experiment in the mouse model has not confirmed the preliminary *in vitro* results, with HI-6 completely overwhelming its activity (Calas et al., 2017). The linkage of the phenyltetrahydroisoquinoline moiety to imidazolium aldoxime displayed good reactivation in comparison with standard reactivators *in*

vitro, but *in vivo* data are missing (Wei et al., 2014). A new series following up on the imidazolium aldoximes, involved zwitterionic tertiary amine analogues (Radić et al., 2012; Kovarik et al., 2013). These zwitterionic compounds rely on the equilibrium of charged and uncharged states of the molecule, with the presumption that the uncharged form could cross the BBB. Low toxicity, good overall CNS availability and good reactivation efficacy make these compounds some of the most promising antidotes. However, notwithstanding good efficacy *in vitro*, their potency was comparable only with 2-PAM (Sit et al., 2011; Gorecki et al., 2017). The lead compound RS194b was tested in macaques after paraoxon and sarin administration, and provided attenuation of cholinergic symptoms after both (Rosenberg et al., 2017, 2018). Moderate efficacy was reported for an amidine-oxime series which exerted only negligible reactivation comparable to 2-PAM at mice and guinea pigs (Cashman and Kalisiak, 2017).

A study by Soukup et al. compared a group of standard quaternary reactivators and representatives of uncharged ones *in vitro*. It has been suggested that increased lipophilicity may be desirable for CNS penetration, but at the expense of reactivating capacity, toxicity and problems with parenteral *in vivo* administration due to low solubility. The higher affinity of uncharged reactivators to AChE can also be harmful in terms of reverse inhibition by the reactivators themselves. An increased affinity to AChE is acceptable only in the case of a superior reactivation effect, which was not observed in this study (Soukup et al., 2018).

5.7. Intranasal delivery

A partially divergent approach by direct application of drugs bypassing the BBB entirely involves intranasal delivery. Within this context, also to be taken into account are other methods including some initially developed for the treatment of brain tumours, such as convection-enhanced delivery (CED) or microchips (Debinski and Tatter, 2009; Mangraviti et al., 2015). These methods require extremely invasive surgical procedures and their versatility and applicability are limited (Hersh et al., 2016).

Intranasal delivery enables bypassing of the BBB thanks to the direct connections of the olfactory and trigeminal nerves between the nose and brain (Hanson and Frey, 2008). According to existing research, pathways involving neuronal connection, the lymphatic system, cerebrospinal fluid, and the vasculature are interconnected in the transport from the nasal cavity to the brain (Dhuria et al., 2010). Intranasal application of obidoxime to paraoxon-poisoned rats completely prevented mortality and reduced the severity and duration of seizures (Krishnan et al., 2016). Thus, this means of delivery seems to be a very promising notion. While many drugs do reach their target in the brain (e.g. insulin, cocaine, morphine), others have been unsuccessful (e.g. estrogen, vitamin B1, melatonin) (Dhuria et al., 2010). However, intranasal delivery enabling permeation to the brain is not as simple as “spray into the nose”. There are still obstacles, which result in hardly reproducible levels of the delivered drug in man. Application of the drug to the nasal cavity needs to be very site-specific to reach the olfactory mucosa, requires specific formulation not to be eliminated by mucociliary clearance. Variation in dosing is also worsened by the fact that the anatomy of individual nasal cavities is different. Therefore, administration techniques display a broad variation and need to be tailored to the individual anatomical characteristics (Gänger and Schindowski, 2018).

6. Conclusion and expert opinion

Since their discovery in the early 1930s, organophosphorus compounds are still notoriously employed in acts of terrorism as well as in high-profile assassinations. Current research devoted to antidotes for OP intoxication still aims to find a novel universal lead candidate that can be applied irrespective of the actual toxic agent. Until such time the novel lead is discovered, we have to rely on the currently-available antidotes represented by pyridinium aldoximes. They are well-known

to be encumbered by several drawbacks, out of which the most pronounced is their low BBB permeability. In respect with this consideration, in the presented review we have made a thorough summary of the recent directions to research seeking or improving the delivery of pyridinium aldoximes to reach higher levels in the brain. Out of these methods, nanoparticles represent a quite effective and perspective way of getting oximes into the brain. Unfortunately, the design and production of nanoparticles are neither a cheap nor an easy task, notwithstanding that many types of NPs also may have a toxic effect in the body. The use of prodrugs and sugar-oximes was rather unsuccessful. The necessary reactivation level was not achieved in animal models, and their penetration into the brain was not much improved comparing with conventional reactivators. Lipophilicity enhancement by either chemical modification of charged, or designing uncharged reactivators, seems to be an auspicious way of targeting the brain. However, higher lipophilicity is associated with an increased risk of adverse effects, an accumulation of the drug in adipose tissue, off-targeting, and, most importantly, low reactivation potency. Another issue of note is the low solubility profile of these agents, impeding further *in vivo* studies and potential parenteral use. To date, the zwitterionic compound RS194B seems to be the most promising agent, even if only on non-human primates. The intranasal route of administration is also very promising, but more in-depth research is urgently needed to confirm the validity of preliminary data and also to solve the issues coined to intranasal delivery, mainly dosing variability.

In our opinion, several approaches to resolve the issue of reactivator delivery to the CNS has been described, however none of these reached clinical use so far. Antidotal, life-saving nature requirements must be always borne in mind and the fast onset and “easy to handle” administration in the field conditions needs to be stressed out. Protection of the brain is definitely important, on the other hand, reaching high levels of centrally-active reactivators may be the culprit for neurotoxicity, especially when reactivator shows higher affinity to native AChE over AChE-OP-inhibited complex (Mercey et al., 2012b; McHardy et al., 2017). This is quite often seen in case of tertiary reactivators. It is known that standard quaternary reactivators cross the BBB in 1–3%, which seems to be too low. On the contrary, it has been shown in case of other drugs, that such a low fraction in the brain might be still very effective (Gunther et al., 2019). Therefore, it is questionable whether enforced brain delivery is really needed considering the fact, that there is a variety of already marketed neuroprotective drugs, which may potentiate oxime reactivator’s therapeutic effect in the brain once applied in time. Despite of the mentioned facts above we still believe that improving availability of oximes in the brain is a valid approach, highlighting either intranasal application or compounds which themselves or due to their formulation *in vivo* readily cross the BBB are hot topic in the field. Nevertheless, suitable combination of known drugs (parasympatolytics, antiglutamatergic and gabaergic agents ideally combined with scavenger and oxime reactivator) is also a valid approach decreasing the neurotoxicity associated with OP poisoning.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was supported by the grant of Grant Agency of the Ministry of Health Czech Republic no. 17-32801A, by institutional project Long-Term Development Plan and the student project no. SV/FVZ201708 (Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Czech Republic).

The authors are grateful to Ian McColl MD, PhD for assistance with the manuscript.

References

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41.
- Abou-Donia, M.B., 1981. Organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21, 511–548. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.21.040181.002455>.
- Abou-Donia, M.B., Lapadula, D.M., 1990. Mechanisms of organophosphorus ester-induced delayed neurotoxicity: type I and type II. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 405–440. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.30.040190.002201>.
- Alkanaimsh, S., Karuppanan, K., Guerrero, A., et al., 2016. Transient expression of tetrameric recombinant human butyrylcholinesterase in *nicotiana benthamiana*. *Front. Plant Sci.* 7, 743. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00743>.
- Antonić, B., Stefanović, D., Mitrović, Z.A., et al., 2002. Standard antidotes along with sodium bicarbonate in organophosphate poisoning. *Proceedings of Chemical and Biological Medical Treatment Symposium (CBMTS)*.
- Arnott, J.A., Planey, S.L., 2012. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert Opin. Drug Discov.* 7, 863–875. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.714363>.
- Askev, B.M., 1956. Oximes and hydroxamic acids as antidotes in anticholinesterase poisoning. *Br. J. Pharmacol.* 11, 417–423.
- Bajgar, J., 2004. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 151–216.
- Calas, A.-G., Dias, J., Rousseau, C., et al., 2017. An easy method for the determination of active concentrations of cholinesterase reactivators in blood samples: application to the efficacy assessment of non quaternary reactivators compared to HI-6 and pralidoxime in VX-poisoned mice. *Chem. Biol. Interact.* 267, 11–16.
- Cashman, J.R., Kalisiak, J., 2017. Blood brain barrier-penetrating oximes for cholinesterases reactivation. *Google Patents*.
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.1>.
- Chambers, J.E., Meek, E.C., Chambers, H.W., 2016. Novel brain-penetrating oximes for reactivation of cholinesterase inhibited by sarin and VX surrogates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1374, 52–58.
- Cornford, E.M., Hyman, S., 2005. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx* 2, 27–43.
- Dadparvar, M., Wagner, S., Wien, S., et al., 2011. HI 6 human serum albumin nanoparticles—development and transport over an *in vitro* blood–brain barrier model. *Toxicol. Lett.* 206, 60–66.
- Dadparvar, M., Wagner, S., Wien, S., et al., 2014. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88, 510–517.
- Debinski, W., Tatter, S.B., 2009. Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors. *Expert Rev. Neurother.* 9, 1519–1527. <https://doi.org/10.1586/em.09.99>.
- Dhuria, S.V., Hanson, L.R., Frey, W.H., 2010. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J. Pharm. Sci.* 99, 1654–1673. <https://doi.org/10.1002/jps.21924>.
- Dickson, E.W., Bird, S.B., Gaspari, R.J., et al., 2003. Diazepam inhibits organophosphate-induced central respiratory depression. *Acad. Emerg. Med.* 10, 1303–1306.
- Eckert, S., Eyer, P., Mückter, H., Worek, F., 2006. Kinetic analysis of the protection afforded by reversible inhibitors against irreversible inhibition of acetylcholinesterase by highly toxic organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.* 72, 344–357.
- Eckert, S., Eyer, P., Worek, F., 2007. Reversible inhibition of acetylcholinesterase by carbamates or huperzine A increases residual activity of the enzyme upon soman challenge. *Toxicology* 233, 180–186.
- Eddleston, M., Buckley, N.A., Eyer, P., Dawson, A.H., 2008. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet* 371, 597–607. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61202-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61202-1).
- Eddleston, M., Chowdhury, F.R., 2016. Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81, 462–470.
- Gallagher, E., Minn, L., Chambers, J.E., Searson, P.C., 2016. *In vitro* characterization of pralidoxime transport and acetylcholinesterase reactivation across MDCK cells and stem cell-derived human brain microvascular endothelial cells (BC1-hBMECs). *Fluids Barriers CNS* 13, 10.
- Gänger, S., Schindowski, K., 2018. Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: a review on architecture, physico-chemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa. *Pharmaceutics* 10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030116>.
- Garcia, G.E., Campbell, A.J., Olson, J., et al., 2010. Novel oximes as blood–brain barrier penetrating cholinesterase reactivators. *Chem. Biol. Interact.* 187, 199–206.
- Ghosh, R., Newman, J.F., 1955. A new group of organophosphorus pesticides. *Chem. Ind.* 118–118.
- Gorecki, L., Korabecny, J., Musilek, K., et al., 2016. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorus nerve agents and pesticides. *Arch. Toxicol.* 90, 2831–2859.
- Gorecki, L., Korabecny, J., Musilek, K., et al., 2017. Progress in acetylcholinesterase reactivators and in the treatment of organophosphorus intoxication: a patent review (2006–2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* 27, 971–985.
- Guerrero, S., Araya, E., Fiedler, J.L., et al., 2010. Improving the brain delivery of gold nanoparticles by conjugation with an amphiphilic peptide. *Nanomaterials* 5, 897–913.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M.R., Konradsen, F., 2007. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Publ. Health* 7, 357.

- Gunther, E.C., Smith, L.M., Kostylev, M.A., et al., 2019. Rescue of transgenic Alzheimer's pathophysiology by polymeric cellular prion protein antagonists. *Cell Rep.* 26, 145–158. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.021>. e8.
- Hanson, L.R., Frey, W.H., 2008. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neurosci.* 9, S5. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-S3-S5>.
- He, F., Xu, H., Qin, F., et al., 1998. Intermediate myasthenia syndrome following acute organophosphates poisoning: an analysis of 21 cases. *Hum. Exp. Toxicol.* 17, 40–45. <https://doi.org/10.1177/096032719801700107>.
- Heldman, E., Ashani, Y., Raveh, L., Rachaman, E.S., 1986. Sugar conjugates of pyridinium aldoximes as antidotes against organophosphate poisoning. *Carbohydr. Res.* 151, 337–347. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)90353-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)90353-7).
- Hersh, D.S., Wadajkar, A.S., Roberts, N., et al., 2016. Evolving drug delivery strategies to overcome the blood brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* 22, 1177–1193.
- Holmstedt, B., 1963. Structure-activity relationships of the organophosphorus anticholinesterase agents. In: Koelle, G.B. (Ed.), *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*. Springer, Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 428–485.
- Hsiao, C.-T., Yang, C.-C., Deng, J.-F., et al., 1996. Acute pancreatitis following organophosphate intoxication. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 34, 343–347. <https://doi.org/10.3109/15563659609013800>.
- Hughes, J.N., Knight, R., Brown, R.F., Marrs, T.C., 1991. Effects of experimental sarin intoxication on the morphology of the mouse diaphragm: a light and electron microscopic study. *Int. J. Exp. Pathol.* 72, 195.
- Jeong, H.C., Kang, N.S., Park, N.-J., et al., 2009. Reactivation potency of fluorinated pyridinium oximes for acetylcholinesterases inhibited by paraoxon organophosphorus agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 1214–1217.
- John, M., Oommen, A., Zachariah, A., 2003. Muscle injury in organophosphorus poisoning and its role in the development of intermediate syndrome. *Neurotoxicology* 24, 43–53.
- Johnson, M.K., Glynn, P., 1995. Neuropathy target esterase (NTE) and organophosphorus-induced delayed polyneuropathy (OPIDP): recent advances. *Toxicol. Lett.* 82, 459–463.
- Joosen, M.J.A., van der Schans, M.J., van Dijk, C.G.M., et al., 2011. Increasing oxime efficacy by blood-brain barrier modulation. *Toxicol. Lett.* 206, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.05.231>.
- Joosen, M.J.A., Vester, S.M., Hamelink, J., et al., 2016. Increasing nerve agent treatment efficacy by P-glycoprotein inhibition. *Chem. Biol. Interact.* 259, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.012>.
- Kassa, J., 2002. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 40, 803–816.
- Kassa, J., Karasova, J.Z., Caisberger, F., et al., 2010. A comparison of reactivating and therapeutic efficacy of the oxime K203 and its fluorinated analog (KR-22836) with currently available oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) against tabun in rats and mice. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 25, 480–484.
- Ketchum, J.S., Sidell, F.R., Crowell, E.B., et al., 1973. Atropine, scopolamine, and diltan comparative pharmacology and antagonists in man. *Psychopharmacologia* 28, 121–145.
- King, A.M., Aaron, C.K., 2015. Organophosphate and carbamate poisoning. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 33, 133–151. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2014.09.010>.
- Kliachyna, M., Santoni, G., Nussbaum, V., et al., 2014. Design, synthesis and biological evaluation of novel tetrahydroacridine pyridine-aldoxime and-amidoxime hybrids as efficient uncharged reactivators of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.* 78, 455–467.
- Korabečny, J., Soukup, O., Doležal, R., et al., 2014. From pyridinium-based to centrally active acetylcholinesterase reactivators. *Mini Rev. Med. Chem.* 14, 215–221.
- Kovarik, Z., Katalinić, M., Sinko, G., et al., 2010. Pseudo-catalytic scavenging: searching for a suitable reactivator of phosphorylated butyrylcholinesterase. *Chem. Biol. Interact.* 187, 167–171. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.02.023>.
- Kovarik, Z., Maček, N., Šit, R.K., et al., 2013. Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE. *Chem. Biol. Interact.* 203, 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.019>.
- Kreuter, J., Alyautdin, R.N., Kharkevich, D.A., Ivanov, A.A., 1995. Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res.* 674, 171–174.
- Krishnan, J.K.S., Arun, P., Appu, A.P., et al., 2016. Intranasal delivery of obidoxime to the brain prevents mortality and CNS damage from organophosphate poisoning. *Neurotoxicology* 53, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.020>.
- Lee, H.J., Zhang, Y., Pardridge, W.M., 2002. Blood-brain barrier disruption following the internal carotid arterial perfusion of alkyl glycerols. *J. Drug Target* 10, 463–467.
- Lee, P., Tai, D.Y.H., 2001. Clinical features of patients with acute organophosphate poisoning requiring intensive care. *Intensive Care Med.* 27, 694–699. <https://doi.org/10.1007/s001340100895>.
- Liu, X., Ye, M., An, C., et al., 2013. The effect of cationic albumin-conjugated PEGylated tanshinone IIA nanoparticles on neuronal signal pathways and neuroprotection in cerebral ischemia. *Biomaterials* 34, 6893–6905.
- Lorke, D.E., Kalasz, H., Petrolanu, G.A., Tekes, K., 2008. Entry of oximes into the brain: a review. *Curr. Med. Chem.* 15, 743–753.
- Lotti, M., Becker, C.E., Aminoff, M.J., 1984. Organophosphate polyneuropathy Pathogenesis and prevention. *Neurology* 34, 658–658.
- Mangravit, A., Tyler, B., Brem, H., 2015. Interstitial chemotherapy for malignant glioma: future prospects in the era of multimodal therapy. *Surg. Neurol. Int.* 6, S78–S84. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.151345>.
- Mann, T.M., Price, M.E., Whitmore, C.L., et al., 2018. Bioscavenger is effective as a delayed therapeutic intervention following percutaneous VX poisoning in the guinea pig. *Toxicol. Lett.* 293, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.11.029>.
- Marrs, T.C., 1993. Organophosphate poisoning. *Pharmacol. Ther.* 58, 51–66. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(93\)90066-M](https://doi.org/10.1016/0163-7258(93)90066-M).
- Masson, P., Lockridge, O., 2010. Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch. Biochem. Biophys.* 494, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.005>.
- Maxwell, D.M., Brecht, K.M., Kopolovitz, L., Sweeney, R.E., 2006. Acetylcholinesterase inhibition: does it explain the toxicity of organophosphorus compounds? *Arch. Toxicol.* 80, 756–760. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0120-2>.
- Maxwell, D.M., Brecht, K.M., Sweeney, R.E., 2013. A common mechanism for resistance to oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. *Chem. Biol. Interact.* 203, 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.024>.
- McHardy, S.F., Wang, H.-Y.L., McCowen, S.V., Valdez, M.C., 2017. Recent advances in acetylcholinesterase inhibitors and reactivators: an update on the patent literature (2012–2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* 27, 455–476. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1272571>.
- Meller, D., Fraser, I., Kryger, M., 1981. Hyperglycemia in anticholinesterase poisoning. *Can. Med. Assoc. J.* 124, 745–748.
- Mercey, G., Renou, J., Verdet, T., et al., 2012a. Phenyltetrahydroisoquinoline-pyridinaldoxime conjugates as efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of inhibited human acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* 55, 10791–10795.
- Mercey, G., Verdet, T., Renou, J., et al., 2012b. Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Acc. Chem. Res.* 45, 756–766. <https://doi.org/10.1021/ar2002864>.
- Mercey, G., Verdet, T., Saint-André, G., et al., 2011. First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 47, 5295–5297. <https://doi.org/10.1039/c1cc10787a>.
- Nachon, F., Brazzolo, X., Trovaslet, M., Masson, P., 2013. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chem. Biol. Interact.* 206, 536–544.
- Nadal, A., Fuentes, E., Pastor, J., McNaughton, P.A., 1995. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1426–1430.
- Nagao, M., Takatori, T., Matsuda, Y., et al., 1997. Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the Tokyo Subway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 198–203. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8110>.
- Nogue, S., Sanz, P., Borondo, J.A., et al., 2003. Fatal lipid pneumonia due to broncoaspiration of isoparaffin after ingestion of an organophosphate insecticide. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 47, 777–779. <https://doi.org/10.1034/j.1399-6576.2003.00122.x>.
- Okuno, S., Sakurada, K., Ohta, H., et al., 2008. Blood-brain barrier penetration of novel pyridinealdoxime methiodide (PAM)-type oximes examined by brain microdialysis with LC-MS/MS. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.09.021>.
- Pardridge, W.M., 2005. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2, 3–14. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3>.
- Pashirova, T.N., Zueva, L.V., Petrov, K.A., et al., 2017. Nanoparticle-delivered 2-PAM for rat brain protection against paraoxon central toxicity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 16922–16932. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02222>.
- Pazdernik, T.L., Emerson, M.R., Cross, R., et al., 2001. Soman-induced seizures: limbic activity, oxidative stress and neuroprotective proteins. *J. Appl. Toxicol.* 21.
- Quinn, D.M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* 87, 955–979. <https://doi.org/10.1021/cr00081a005>.
- Rachaman, E.S., Ashani, Y., Leader, H., et al., 1979. Sugar-oximes, new potential antidotes against organophosphorus poisoning. *Arzneimittelforschung* 29, 875–876.
- Radić, Z., Šit, R.K., Kovarik, Z., et al., 2012. Refinement of structural leads for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *J. Biol. Chem.* 287, 11798–11809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333732>.
- Rapoport, S.I., Robinson, P.J., 1986. Tight-junctional modification as the basis of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 481, 250–267.
- Renou, J., Loidice, M., Arbolás, M., et al., 2014. Tryptoline-3-hydroxypyridinaldoxime conjugates as efficient reactivators of phosphorylated human acetyl and butyrylcholinesterases. *Chem. Commun.* 50, 3947–3950.
- Renou, J., Mercey, G., Verdet, T., et al., 2013. Syntheses and in vitro evaluations of uncharged reactivators for human acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Chem. Biol. Interact.* 203, 81–84.
- Rice, H., Mann, T.M., Armstrong, S.J., et al., 2016. The potential role of bioscavenger in the medical management of nerve-agent poisoned casualties. *Chem. Biol. Interact.* 259, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.04.038>.
- Riley, B., 2003. The toxicology and treatment of injuries from chemical warfare agents. *Curr. Anaesth. Crit. Care* 14, 149–154.
- Rosenberg, Y.J., Mao, L., Jiang, X., et al., 2017. Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reverses early and advanced symptoms in macaques exposed to sarin vapor. *Chem. Biol. Interact.* 274, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.07.003>.
- Rosenberg, Y.J., Wang, J., Ooms, T., et al., 2018. Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reactivates and reverses advanced symptoms of lethal inhaled paraoxon in macaques. *Toxicol. Lett.* 293, 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.10.025>.
- Rusyniak, D., Naňagas, K., 2004. Organophosphate poisoning. *Semin. Neurol.* 24, 197–204. <https://doi.org/10.1055/s-2004-830907>.
- Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., et al., 2016. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J. Control. Release* 235, 34–47.
- Savage, E.P., Keefe, T.J., Mounce, L.M., et al., 1988. Chronic neurological sequelae of acute organophosphate pesticide poisoning. *Arch. Environ. Health Int. J.* 43, 38–45.
- Senanayake, N., Karaliedde, L., 1987. Neurotoxic effects of organophosphorus

- insecticides. *N. Engl. J. Med.* 316, 761–763.
- Sheikov, N., McDannold, N., Sharma, S., Hynynen, K., 2008. Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound Med. Biol.* 34, 1093–1104. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2007.12.015>.
- Shih, T.-M., Koplovitz, I., Kan, R.K., McDonough, J.H., 2012. In Search of an Effective in Vivo Reactivator for Organophosphorus Nerve Agent-Inhibited Acetylcholinesterase in the Central Nervous System. Army Medical Research Inst of Chemical Defense Aberdeen Proving Ground MD Pharmacology Branch.
- Sidell, F.R., 1974. Soman and sarin: clinical manifestations and treatment of accident of accidental poisoning by organophosphates. *Clin. Toxicol.* 7, 1–17. <https://doi.org/10.3109/15563657408987971>.
- Sit, R.K., Radić, Z., Gerardi, V., et al., 2011. New structural scaffolds for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *J. Biol. Chem.* 286, 19422–19430.
- Soukup, O., Korabecny, J., Malinák, D., et al., 2018. In Vitro and in Silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning—A New Hope or a Blind Alley? (Accessed 22 Sep 2018). <https://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/mc/2018/00000014/00000003/art00010>.
- Sungur, M., Güven, M., 2001. Intensive care management of organophosphate insecticide poisoning. *Crit. Care* 5, 211. <https://doi.org/10.1186/cc1025>.
- Trovaslet-Leroy, M., Musilova, L., Renault, F., et al., 2011. Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents. *Toxicol. Lett.* 206, 14–23.
- Ueno, M., 2007. Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *Curr. Med. Chem.* 14, 1199–1206.
- Voicu, V.A., Medvedovici, A.V., Sakurada, K., et al., 2016. The forgotten or underestimated relevance of biopharmaceutical-based assessments for the oral absorption studies of oxime reactivators. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 12, 743–752. <https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1179282>.
- Wadia, R.S., Sadagopan, C., Amin, R.B., Sardesai, H.V., 1974. Neurological manifestations of organophosphorus insecticide poisoning. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 37, 841–847. <https://doi.org/10.1136/jnnp.37.7.841>.
- Wagner, S., Kulleitner, J., Zensi, A., et al., 2010. Nanoparticulate transport of oximes over an in vitro blood-brain barrier model. *PLoS One* 5, e14213.
- Wagner, S., Zensi, A., Wien, S.L., et al., 2012. Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model. *PLoS One* 7, e32568.
- Wang, E.C., Wang, A.Z., 2014. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* 6, 9–26. <https://doi.org/10.1039/c3ib40165k>.
- Wei, Z., Liu, Y.-Q., Zhou, X.-B., et al., 2014. New efficient imidazolium aldoxime reactivators for nerve agent-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 5743–5748. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.055>.
- Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., Car, H., 2012. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol. Rep.* 64, 1020–1037.
- Wilhelm, C.M., Snider, T.H., Babin, M.C., et al., 2014. A comprehensive evaluation of the efficacy of leading oxime therapies in guinea pigs exposed to organophosphorus chemical warfare agents or pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 281, 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.10.009>.
- Worek, F., Reiter, G., Eyer, P., Sznitz, L., 2002. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Arch. Toxicol.* 76, 523–529.
- Worek, F., Thiermann, H., Sznitz, L., Eyer, P., 2004. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* 68, 2237–2248. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.07.038>.
- Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2016a. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chem. Biol. Interact.* 259, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.cb.2016.04.032>.
- Worek, F., Thiermann, H., Wille, T., 2016b. Catalytic bioscavengers in nerve agent poisoning: a promising approach? *Toxicol. Lett.* 244, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.07.012>.
- Yanagisawa, N., Morita, H., Nakajima, T., et al., 1995. Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet* 346, 290–293. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)92170-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)92170-2).
- Yang, J., Fan, L., Wang, F., et al., 2016. Rapid-releasing of HI-6 via brain-targeted mesoporous silica nanoparticles for nerve agent detoxification. *Nanoscale* 8, 9537–9547. <https://doi.org/10.1039/C6NR03477A>.
- Žďárová Karasová, J., Zemek, F., Kassa, J., Kuča, K., 2014. Entry of oxime K027 into the different parts of rat brain: comparison with obidoxime and oxime HI-6. *J. Appl. Biomed.* 12, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2013.01.001>.
- Zhang, F., Xu, C.-L., Liu, C.-M., 2015. Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma. *Drug Des. Dev. Ther.* 9, 2089–2100. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S79592>.
- Zoltani, C.K., 2009. Cardiovascular system as a target of chemical warfare agents. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Elsevier, pp. 493–507.

Publikace 1Publikace 3

Godyn J., Gucwa D., Koblrová T., Novák M., Soukup O., Malawska B., Bajda M.: Novel application of capillary electrophoresis with a liposome coated capillary for prediction of blood-brain barrier permeability. *Talanta*, 217, 2020:121023.

Míra zapojení autora dizertační práce:

- stanovení predikce penetrace zkoumaných látek skrz HEB PAMPA metodou
- vyhodnocení dat včetně statistického zpracování



Novel application of capillary electrophoresis with a liposome coated capillary for prediction of blood-brain barrier permeability

Justyna Godyń^a, Dominika Gucwa^a, Tereza Koblrova^b, Martin Novak^{b,c}, Ondrej Soukup^b, Barbara Malawska^a, Marek Bajda^{a,*}

^a Department of Physicochemical Drug Analysis, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Kraków, Poland

^b Biomedical Research Center, University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic

^c Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:
Capillary electrophoresis
Liposomes
Blood-brain barrier
Permeability
Passive diffusion

ABSTRACT

Profiling blood-brain barrier permeability of bioactive molecule is an important issue in early drug development, being a part of the optimization process of a compound's physicochemical properties, and hence pharmacokinetic profile. The study aimed to develop and optimize a new *in vitro* method for assessment of the compound's brain penetration. The tool is proposed as an alternative to the PAMPA-BBB (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay for Blood-Brain Barrier) and based on a capillary electrochromatography (CEC) technique. It utilizes liposomes as structural substitutes of biological membranes, which are used as a capillary inner wall coating material. Following optimization of analysis conditions, migration times for a set of 25 reference drugs (mainly non-ionized in pH 7.4) were examined in a liposome coated capillary. On that basis, the retention factor ($\log k$) was determined for each reference drug. Obtained $\log k$ values and experimentally received reference permeability parameters: $\log BB$ (*in vivo* data) and $\log P_e$ (PAMPA-BBB data) were compared with one another. Correlation coefficients were calculated, giving comparable results for CEC $\log k/\log BB$ and analogical PAMPA-BBB $\log P_e/\log BB$ analyses. Approximate ranges of $\log k$ for the central nervous system (CNS) permeable (CNS (+)) and non-permeable (CNS (-)) drugs were established.

1. Introduction

The drug development process requires both the evaluation of the pharmacological activity of a newly synthesized molecule and the optimization of its pharmacokinetic profile, defined mostly by physicochemical properties. Optimal physicochemical properties determine a compound's permeability through biological membranes, affecting all ADMET processes (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity). Interaction between a bioactive molecule and the biological membrane is essential in terms of both, its absorption from the gastrointestinal tract and its penetration through the other barriers in the body, including the particularly important blood-brain barrier (BBB). For potential central nervous system (CNS) drugs, profiling their BBB permeability is crucial for the further development of these molecules. A drug intended to interact with its target (receptor, enzyme or other) located in CNS must cross the BBB to induce the desired activity. A compound that lacks optimal physicochemical properties determining brain penetration is usually disqualified, even despite the strong *in vitro*

activity toward its biological target. Information about BBB permeability at the early stage of the new molecule development process allows modification of the potential drug structure for its better CNS exposure. Brain penetration is important not only for drugs acting within the CNS; it is also essential for peripherally active compounds due to their possible adverse brain-related effects.

BBB is the continuous layer formed by the brain endothelial cells of brain capillaries. Transport through the endothelium is highly restricted because of the presence of complex tight junctions between the cells of the capillary wall, but also due to the active efflux transporters, mainly P-glycoprotein (P-gp, MDR1) [1,2]. The main function of the impermeability of BBB for many compounds is to protect the brain from the potentially toxic substances, and also to maintain a constant internal environment optimal for neuronal function. Thanks to the BBB, the composition of the extracellular fluid is quite independent of the composition of the circulating blood [3]. Penetration of the compounds through the BBB is carried out exclusively by transcellular passive diffusion or transcellular active/facilitated transport.

* Corresponding author. Department of Physicochemical Drug Analysis, Faculty of Pharmacy, Jagiellonian University Medical College, Medyczna 9, 30-688, Kraków, Poland.

E-mail address: marek.bajda@uj.edu.pl (M. Bajda).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121023>

Received 12 December 2019; Received in revised form 3 April 2020; Accepted 7 April 2020

Available online 11 April 2020

0039-9140/© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

To date, many diverse techniques have been utilized to quantify and assess the compounds' BBB permeability [4–18]. In general, these are *in vivo*, *in vitro* and *in silico* methods. *In vivo* techniques, usually performed to obtain the log BB (logarithm of brain and blood drug concentration ratio measured in a steady-state) or log PS (logarithm of the permeability-surface area coefficient) permeability parameters, provide results based on the real physiological conditions. However, *in vivo* measurements are complex, expensive, time-consuming, require animals and surgical expertise as well as a large amount of highly pure test compounds. To achieve a high throughput requirement and simultaneously to reduce the use of animal models, *in vitro* and *in silico* methods have been proposed extensively in the recent few decades. *In silico* techniques, often based on the quantitative structure-activity relationship and software calculations have become popular for BBB permeability prediction due to their many advantages. These are low cost, short time of analysis, environment-friendly character and high throughput; yet still some disadvantages limit the use of the *in silico* models in the drug discovery pipeline. The main point is that these methods involve a large number of molecular descriptors and complicated calculations, still being unable to take into account all the physiological processes occurring *in vivo*. As a result, experimental data and *in vitro* models are still more desired. Often, experimentally obtained *in vitro* permeability values are combined with calculated molecular descriptors related to CNS permeability, to achieve better prediction of drug-membrane transport. *In vitro* strategies utilize cell-based and non-cell-based assays. There are several *in vitro* cell-based methods for the assessment of both passive diffusion and active transport of compounds through the BBB. The best of these are those based on primary cultures of brain capillary endothelial cells, but surrogate BBB models based on non-cerebral cell lines are also often utilized. Surrogate BBB models employ epithelial-like cells, such as Madin-Darby Canine Kidney cells transfected with the human MDR1 gene (MDCK-MDR1 permeability assay) and the human colorectal adenocarcinoma cell line (Caco-2 permeability assay) [19,20]. However, methods predicting drug BBB passive and facilitated permeability, investigating possible influx and/or efflux ratios are costly and time-consuming and are not necessary for simple passive diffusion studies in the early phase of drug research for screening compounds. Besides, most CNS drugs, predominantly characterized as small molecules, are transported into the brain mainly through the passive diffusion [1,3,4,21]. Therefore, *in vitro* non-cell-based passive diffusion permeability assays are routinely performed at the early CNS drug development stage. Among these methods, separation techniques, as well as the Parallel Artificial Membrane Permeability Assay for Blood-Brain Barrier (PAMPA-BBB), are utilized for BBB permeability assessment. Separation methods include chromatographic and electrophoretic strategies, both of which meet low cost, high throughput, and high reproducibility criteria. In recent years many research groups have proposed their concepts of modeling drug-membrane transport based on chromatographic principles. Simple reversed-phase thin layer chromatography (RP-TLC) based model as well as the methods focused on the reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) have been developed to obtain experimental retention parameters [5]. Often, experimental results have been combined with computed molecular descriptors [5,10,11]. To improve the model of a biological membrane, standard HPLC stationary phases have been replaced with immobilized artificial membranes (IAM) and utilized for brain permeability studies [12,13]. Also, microemulsion liquid chromatography (MELC) [14–16], as well as micellar liquid chromatography (MLC) [5,15] and a variant of MLC named biopartitioning micellar chromatography (BMC) [17] have been proposed, using micelles buffer solutions and microemulsions as mobile phases of a chromatographic system to more closely mimic the analytes – membranes interactions. G. Russo et al. [18] combined compounds' exposed polarity measured experimentally by supercritical fluid chromatography (SFC) with *in silico* calculated water-accessible surface area values and other descriptors to model the uptake of drugs through the

BBB. Despite many advantages of LC-based methods, including high throughput and excellent repeatability of results, some limitations have also been reported. These are high consumption of organic solvents affecting the cost of analyses and often the requirement of the addition of *in silico* descriptors to the experimentally obtained permeability parameters (X. Subirats et al. work [14] is an exception here). In the case of IAM-based methods, utilized artificial membranes possess the monolayer structure. As a result, the test compounds only bind to them and do not pass through the membranes, unlike physiological conditions. In the last years the *in vitro* electromigration models, based on the capillary electrophoresis (CE), have been gaining importance in terms of the application for BBB permeability studies. CE is an analytical technique based on the separation principles; the analytes are separated under the influence of the applied voltage, according to their charge, mass, and structure. Separation of tested compounds in the capillary is an effect of two phenomena: electrophoretic migration (migration of charged particles in the electric field toward the oppositely charged electrode) and electroosmotic flow (EOF) [22]. The EOF is created in the capillary by the cations migrating toward the cathode, dragging the solvent (with all ions and neutral particles) along. The cations form a so-called double electrical layer, as a result of their interaction with negatively charged silanol groups of the inner wall of a typical silica-fused capillary. Electrophoretic strategies preserve all LC advantages. Also, they are characterized by simplicity, high separation efficiency, economical use of solvents and environment-friendly nature [6]. To date, CE based microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) [7], biopartitioning micellar electrokinetic chromatography (BMEKC) [9] and liposomal electrokinetic chromatography (LEKC) [8] have been applied for assessment of compounds brain penetration.

Despite many proposed separation techniques, currently, the PAMPA-BBB tool is widely used as a high throughput *in vitro* BBB permeability testing method, including by our research team [23–25]. The assay was developed by L. Di et al. (2003 [4]), as a modification of the method for studying biological membranes permeability, discovered and described by M. Kansy et al. (1998 [26]). However, next to its many advantages, also in this technique some limitations do exist, primarily because of the non-bilayer lipid structure of the assay's artificial membrane and dodecane diluent. Besides, the test is quite expensive for a small academic research team. Therefore, there is a need for an alternative, rapid and relatively cheap *in vitro* model, mimicking human BBB, for assessment of permeability of new compounds with potential therapeutic use.

The presented study aimed to develop and optimize an *in vitro* method for studying BBB permeability of compounds, based on the CE technique, taking advantage of liposomes as structural analogs of the natural biological membranes. The developed method might be an alternative to the currently used PAMPA-BBB assay, as a tool for screening compounds at the early drug discovery stage.

The developed method uses a capillary electrochromatography technique (CEC) which is a variant of CE. CEC employs a packed or wall-coated capillary (open-tubular CEC). In an open-tubular CEC, a chromatographic phase is created in the capillary by covering its inner surface. Different phospholipids can be used as a capillary coating material, usually forming a semi-permanent layer, non-covalently attached to the silica wall. In the presented method, the capillary is covered internally with a phospholipid layer, composed of large unilamellar liposomes (large unilamellar vesicles, LUVs). The coating mimics BBB, as liposomes are structurally similar to the biological cell membrane. Once the capillary is well coated, the double electrical layer is still formed, but it is less effective when compared to an uncoated one because liposomes cover negatively charged silanol groups of the capillary wall. As a result, a suppressed EOF is observed (Fig. 1). Also, in a liposome coated capillary, after appropriate modifications of the analysis conditions, separation of the tested compounds is influenced by their interaction with the liposomal layer, due to their physicochemical properties determining permeation (e.g., polar surface area and log P).

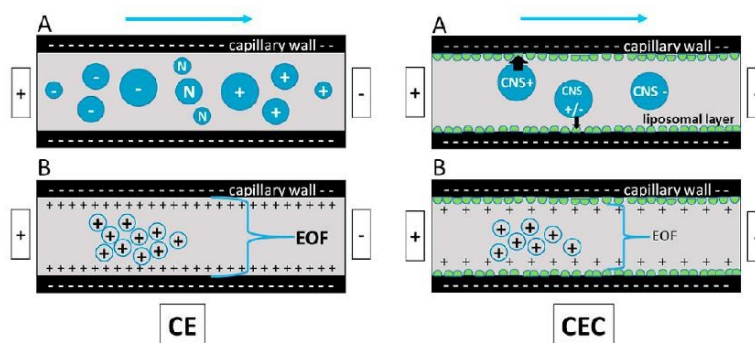


Fig. 1. Scheme of electrophoretic migration (A) and electroosmotic flow EOF (B) in CE and CEC (in the developed method). In CEC variant suppressed EOF is observed. The blue arrows indicate the direction of the ions and solvent migration in the capillary. The black arrows show the interaction of compounds with a liposomal layer. CNS(+); CNS(+/-); CNS(-) are compounds with good, uncertain and poor brain permeability, respectively; for simplicity only neutral in pH 7.4. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Simultaneously, separation is still dependent on compound charge or mass parameters which alone impact migration times in the uncoated capillary. Therefore, the CEC system is defined as a combination of compound electrophoretic migration and simultaneously its retention due to the presence of a liposomal coating. For neutral agents or those predominantly uncharged in the analysis conditions (also for zwitterions with a summary charge equal to 0), their charge related electrophoretic migration is minimized and separation is mainly dependent on the interaction with liposomes.

We assumed that neutral compounds with high BBB permeability should interact with the liposome layer mimicking the BBB (by entering the liposomes) and migrate toward the cathode with lower velocity. In contrast, molecules with low CNS penetration should quickly pass through the capillary due to the weak interaction with the liposomal coating (Fig. 1).

In the PAMPA-BBB assay, an extract from a porcine brain containing specific phospholipids is used to create an artificial membrane that mimics BBB [4]. In the developed method, phospholipids are utilized to prepare the liposomal layer of the inner capillary wall. However, unlike the PAMPA-BBB assay, phospholipids are dissolved in aqueous buffer solution, where they tend to self-assemble (due to their amphiphilic properties) into bilayer lamellar structures, spontaneously forming liposomes [27,28]. Thus, the created liposomal coating possesses a bilayer structure, being closely related to the phospholipid bilayer core of the cellular membrane. Liposomes are of great interest to investigate the interactions of compounds with natural phospholipid bilayers [29,30]. Studies utilizing liposomes in CE were initiated by Zhang et al., in 1995 [31]. Subsequently, many original papers have been published on the application of vesicles in the electrophoretic analysis. Liposomes have been used as a pseudo-stationary phase in the LEKC technique [8,32–34] or as a coating material of the inner wall of the capillary (CEC technique) [33,35–37]. The first successful liposome capillary coating was carried out by Yang et al., in 1998 [38]. Since that time, many diverse vesicle compositions and separating conditions have been studied in the field of the CEC technique [39–42]. So far, however, the LEKC technique is the only one liposomal chromatographic tool based on CE to be used for the prediction of gastrointestinal absorption of compounds [34], and also for testing skin permeability [43] and penetration across the BBB [8]. To the best of our knowledge, to date, there is no validated and optimized CEC method utilizing liposomes as the capillary inner wall coating material, which has been applied for the prediction of BBB penetration of bioactive molecules. Therefore, the development of such a model seems to be innovative, valuable and

significant for the studies into drug discovery.

The presented CEC method, used for studying the interactions of compounds with biological membranes retains many CE advantages. These are the short time of analysis and the precision of the obtained experimental results, as well as the small amounts of tested compounds required for successful analysis. Also, substances of low purity can be used as the impurities are separated from the main product. The automated instruments make CEC an easy to perform technique; fused silica capillaries are durable, easy to clean and may be utilized repeatedly for different analyses. The amount of phospholipids needed to create liposomes and perform the study is small (when compared to methods, where the vesicles are used as a pseudo-stationary phase, like LEKC and other EKC models), which significantly reduces the cost of analysis. Besides, the structure and composition of liposomes can be easily modified, which is useful, considering the method optimization. Simultaneously, the proposed CEC method retains most of the good features of the LC-based strategies; it is even considered to be a hybrid between CE and HPLC techniques. However, as an electrophoretic tool it is characterized also by simplicity, high separation efficiency, economical use of solvents and environment-friendly nature – goals hard to achieve in case of many LC-based methods. Moreover, unlike HPLC and IAM-HPLC chromatographic stationary phases, the CEC liposomal layer mimicking BBB preserves the bilayer structure, characteristic for natural biological membranes.

The work plan for the development of the BBB permeability modeling method included optimization of the separation conditions, preparation of the appropriate calibration curves and finally method validation. In the first stage of analysis, described in this paper, after coating the capillary with a liposomal layer, separation parameters were optimized. Then, the migration times for the set of 25 selected reference drugs were examined. On this basis, a logarithm of the retention factor ($\log k$) and the electrophoretic mobility were determined for each reference drug. $\log k$ values were compared with experimentally obtained reference BBB permeability parameters, such as $\log BB$ (logarithm of brain and blood drug concentration ratio measured in a steady-state) or $\log P_e$ (logarithm of the effective permeability). Correlation coefficients were calculated on the basis of the prepared calibration curves. For comparison purposes, linear regression analysis of $\log P_e$ and $\log BB$ parameters was also done.

2. Materials and instruments

2.1. Chemicals

References (purity > 99.5%) were purchased as follows: acetaminophen, aminophenazone, carbamazepine, cetirizine dihydrochloride, hexobarbital sodium, levodopa, norfloxacin, omeprazole, theobromine, theophylline (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany); caffeine, phenytoin (Alfa Aesar, Kandel, Germany); antipyrine (Fluka, Seelze, Germany); barbital (Polfá Tarchomin, Warszawa, Poland); hydrocortisone (Fagron, Kraków, Poland); and progesterone (Caesar & Loretz, Hilden, Germany). The following drugs were extracted with chloroform from tablets: alprazolam (Zomiren SR; KRKA, Nove Mesto, Slovenia); diazepam (Relanium; GlaxoSmithKline Pharmaceuticals, Poznań, Poland); digoxin (Digoxin Teva; Teva Pharmaceuticals, Warszawa, Poland); fexofenadine (Fexofast; Galena, Wrocław, Poland); fluconazole (Fluconazole; Polfarmex, Kutno, Poland); lamotrigine (Lamilept; Teva Pharmaceuticals, Warszawa, Poland); midazolam (Dormicum; Roche, Warszawa, Poland); oxazepam (Oxazepam; Espefa, Kraków, Poland); and zolpidem (Zolsana; KRKA, Nove Mesto, Slovenia); the solvent (chloroform) was then evaporated to dryness.

Methanol (hypergrade for LC-MS), chloroform (HPLC purity), sodium hydroxide (NaOH, 1.0 M, CE purity), HEPES buffer (40 mM, pH adjusted to 7.4 by addition of 1.0 M NaOH), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-*L*-serine (PS), and porcine Brain Polar Lipid Extract (Avanti, Alabaster, AL, USA) were obtained from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Hydrochloric acid (HCl, 36%) was purchased from Stanlab (Lublin, Poland). Purified water was derived from the deionization unit (Hydrolab, Straszyn, Poland). HEPES buffer and HCl were filtered (0.45 µm pore size filter) before use.

2.2. Materials

Polycarbonate filter units of 0.1 µm pore size and the syringe filter units with a pore size of 0.45 µm were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Uncoated fused-silica capillary (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) 59.1 cm × 50 µm of internal diameter and 375 µm of external diameter, with an effective length of 49 cm was used throughout the study. Alternatively, we used a capillary of 20 µm in internal diameter (other parameters unchanged) obtained from Labstore (Warsaw, Poland).

2.3. Instruments

All CEC analyses were performed on a P/ACE MDQ instrument with a DAD detector (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). The UV detection of the analytes was carried out at a wavelength of 220 nm. We used 32 Karat Software version 8.0 to record and analyze obtained electropherograms. Liposome extrusion was performed using LiposoFast Liposome Factory (Avestin Europe, Mannheim, Germany).

3. Methods – optimization of the new CEC method

3.1. Separation buffer

All experiments were performed using 40 mM HEPES buffer (pH 7.4) as the background electrolyte solution. According to the earlier studies [35,37] on CEC with phospholipid liposome coatings, HEPES buffer has been found to be the best one to achieve a good liposome layer in a fused-silica capillary. In pH 7.4, protonated piperazine amino groups of HEPES are able to act as linkers between a negatively charged fused-silica capillary wall and anionic liposomes, resulting in a stable capillary coating.

3.2. Liposome composition and preparation

The anionic liposomes used in the main study were composed of POPC and bovine brain PS in the molar ratio 80:20 mol% (POPC/PS liposomes). According to the literature [35], such composed vesicles cover the inner wall of the capillary in a stable way, thus enabling effective separation of tested compounds. It is also known, that a capillary coating composed of LUVs gives better repeatability of the EOF in comparison with the layer prepared of multilamellar vesicles (MLVs), due to the homogeneity of LUVs, which is hard to achieve in case of MLVs [44]. Therefore, in the developed method we utilized LUVs that were produced by extrusion of MLVs solution.

To prepare liposomes, appropriate amounts of phospholipids were dissolved in an organic solvent (chloroform, methanol) to form lipid stock solutions. Resultant stock solutions were mixed in order to give the desired composition with an appropriate molar ratio. The mixture was evaporated to dryness under a stream of argon and left for 24 h under the low pressure to evacuate traces of solvent. Lipid residues were next hydrated in separation buffer at 60 °C (lipid concentration of 4 mM) and maintained at this temperature for 1 h with vigorous vortexing. Obtained MLVs were processed into LUVs by 19 times extrusion through 0.1 µm pore size polycarbonate filters. The liposome solutions were stored in a refrigerator and used within 6 days.

Alternatively, we used anionic liposomes prepared from porcine Polar Brain Lipid (PBL) Extract (also utilized in the PAMPA-BBB assay [4]), according to the procedure described above. PBL Extract utilized in this study is composed of various phospholipids, including phosphatidylcholine (12.6%), phosphatidylethanolamine (33.1%), phosphatidylinositol (4.1%), PS (18.5%) and phosphatidic acid (0.8%). It also contains 30.9% of the unknown, mainly lipid components (cerebrosides, sulfatides), so the concentration of the prepared liposomal solution was defined as approximately 4 mM. The obtained liposomal solution was diluted to approximately 3 mM and used as a capillary coating material.

Since PBL Extract contains over 23% of negatively charged phospholipids (PS, phosphatidylinositol and phosphatidic acid), both PBL and POPC/PS liposomes were negatively charged.

3.3. Sample preparation

Each tested compound – in the amount of approximately 1.5 mg – was dissolved in 1 mL volume of methanol to give a stock solution. Prepared stock solutions were mixed with separating HEPES buffer (40 mM) in a 1:9 ratio and filtered through the 0.45 µm pore size filters to give final samples, ready for the injection into the capillary. Methanol, used as a solvent for the compounds, was also the EOF marker.

3.4. Coating procedure

The inner capillary wall was covered with a LUV layer, according to the known procedure [35], with only small modifications.

Liposomes may form two types of coatings on the silica surface of a capillary wall: a supported phospholipid bilayer (SLB) or a supported vesicular layer (SVL). The type of formation and the effectiveness of the capillary coating process has been studied, using atomic force microscopy [45–47], or the dissipative quartz crystal microbalance (QCM) technique. Viitala et al. [48] used the QCM technique to analyze the formation of a capillary layer, created by liposomes composed of the same phospholipid components (POPC/PS) as utilized in this study. The obtained coating was characterized as a viscoelastic and stable SVL type. The SVL layer is more suitable for the CEC technique, because it increases the probability of interaction between analytes and liposomes, due to its larger surface area in comparison to the SLB layer.

The coating process was conducted as follows: 10 min of rinsing the capillary with 0.5 M HCl under the pressure of 93.8 kPa; next, 15 min of

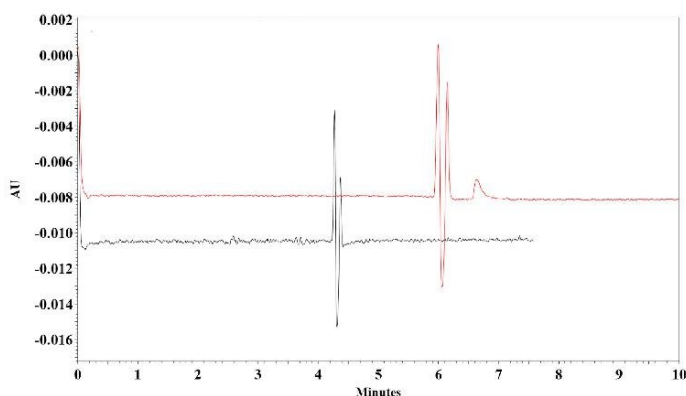


Fig. 2. Separation of hydrocortisone and progesterone mixture under applied voltage of 20 kV, in the uncoated capillary (black marked) and in the POPC/PS liposome coated capillary (red marked), both 50 μm of internal diameter. In the presence of the liposomal coating, separation of both steroids occurs. Due to the retention, progesterone migrates toward cathode with lower velocity. Hydrocortisone interaction with the phospholipid layer is weak. Black peaks in order: methanol, unseparated hydrocortisone and progesterone peak. Red peaks in order: methanol, hydrocortisone, progesterone. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

rinsing with water; and finally, 10 min of rinsing with the 3 mM liposome solution, both also under the pressure of 93.8 kPa. Then the capillary was left to stand filled with the liposome solution for another 15 min.

The effectiveness of the coating procedure was verified by measuring the EOF changes in the coated capillary in comparison to the uncoated one. The electroosmotic mobility μ_{EOF} was determined using methanol as a neutral marker, as it displays almost no interaction with the capillary wall [49]. In a coated capillary, the EOF was suppressed, and the methanol μ_{EOF} value was lower (see results section). The efficacy of the capillary coating was also confirmed by the separation of the mixture of tested drugs (Fig. 2).

In a liposome coated capillary, separation of references was influenced by their interaction with the liposomal layer. Compound migration times were prolonged for all references (due to suppressed EOF), yet calculated $\log k$ parameters varied according to drug affinity to liposomes. For molecules with weak liposome interaction, almost no differences in $\log k$ values were observed, between experiments conducted in coated and uncoated capillaries.

3.5. Separating conditions

Electrophoretic runs were conducted at the normal polarity mode, under the 20 kV voltage, resulting in a current of about 10 μA . Also, 13 kV and 10 kV voltages were tested to achieve the best compound separation. A lower voltage resulted in a small separation improvement, but an unfavorable prolonged time of analysis was observed (Fig. 3).

The temperature of the capillary chamber was set to 25 $^{\circ}\text{C}$, according to the previously reported procedure [35], as it provides satisfactory repeatability of the electroosmotic flow both in the uncoated and the in the coated capillary. Prior to each analysis, the capillary was rinsed with 40 mM HEPES buffer pH 7.4 for 2 min (93.8 kPa), to eliminate any unbound liposomes and other contaminations. The sample was injected into the capillary at a pressure of 4.8 kPa with a duration time of 6 s (50 μm capillary) or at a pressure of 13.8 kPa with 7 s of duration time (20 μm capillary). After sample injection, the ends of the capillary were cleaned by immersion in water for 0.05 min, thus avoiding contamination of other solutions. 40 mM HEPES buffer pH 7.4 was used as a separation solute. The buffer was changed in vials every six runs to ensure its quality. The time of analysis was approximately 5–7 min for 20 kV voltage, and up to 11–14 min for 10 kV voltage. Each experiment was performed in triplicate. To remove the capillary liposomal coating, the cleaning procedure was followed by 10 min of water rinsing, then 40 min of flushing with a mixture of chloroform and

methanol in a 2:1 ratio (v/v) and finally 5 min of air drying, all steps with 93.8 kPa pressure.

4. Methods – PAMPA-BBB assay

The penetration of the reference compounds across BBB was estimated using the PAMPA-BBB assay in order to obtain the experimental $\log P_e$ parameters. In this study, PAMPA-BBB was used as a non-cell-based *in vitro* assay [23,25] carried out in a coated 96-well membrane filter. The filter membrane of the donor plate was coated with PBL (Avanti, USA) in dodecane (4 μL of 20 mg/mL PBL in dodecane) and the acceptor well was filled with 300 μL of phosphate buffer saline, (PBS pH 7.4; V_A). The tested compounds were first dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) and then diluted with PBS pH 7.4 to reach the final concentrations of 50–500 μM in the donor well. The final concentration of DMSO did not exceed 0.5% (v/v) in the donor solution. A total of 300 μL of the donor solution (V_D) was added to the donor wells and the donor filter plate was carefully put on the acceptor plate so that the coated membrane was “in touch” with both donor solution and acceptor buffer. In principle, a test compound diffused from the donor well through the PBL membrane (Area = 0.28 cm^2) to the acceptor well. The concentrations of the tested compound in both donor and the acceptor wells were assessed after 3, 4, 5 and 6 h of incubation respectively in quadruplicate using a Synergy HT UV plate reader (Biotek, USA) at the maximum absorption wavelength of each compound ($n = 3$) or by HPLC/MS ($n = 2$), where a low signal was observed by UV-VIS spectrophotometry (*i.e.* barbital, cetirizine, digoxin, hexobarbital, phenytoin). In addition, a solution of theoretical compound concentration, simulating the equilibrium state established if the membrane were ideally permeable, was prepared and assessed as well. Concentrations of the compounds in the donor and acceptor wells and equilibrium concentrations were calculated from the standard curve and expressed as the permeability (P_e) according to Equation (1) [50,51],

$$\log P_e = \log \left\{ C \times -\ln \left(1 - \frac{[\text{drug}]_{\text{acceptor}}}{[\text{drug}]_{\text{equilibrium}}} \right) \right\} \quad (1)$$

where V_A is the volume of the acceptor compartment, V_D is the donor well volume, Area is the accessible filter area and Time is the incubation time.

4.1. UHPLC-MS specification

UHPLC-MS analysis of selected donor and acceptor solutions was

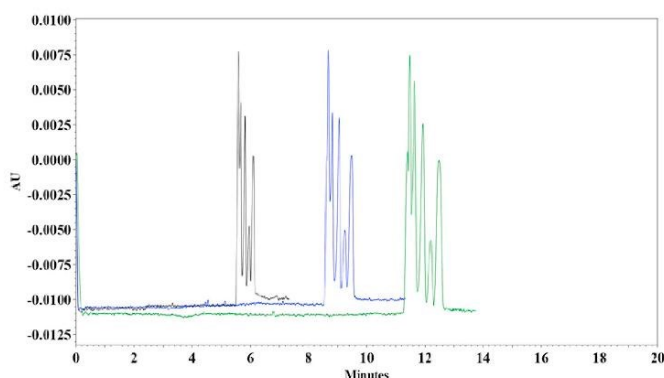


Fig. 3. Separation of a mixture of 5 reference drugs (peaks in order: methanol, norfloxacin, hydrocortisone, theophylline, hexobarbital, phenytoin), under applied voltage of 20 kV (marked in black), 13 kV (marked in blue) and 10 kV (marked in green). A 50 μm of internal diameter capillary, POPC/PS liposome coating. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

carried out using a Dionex UltiMate 3000 RS UHPLC analytical system coupled with a Q Exactive Plus hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer (MS). This equipment was used to determine high-resolution mass spectra (HRMS) and unknown concentrations of five compounds resulting from the PAMPA-BBB assay (barbital, cetirizine, digoxin, hexobarbital, phenytoin). The chromatographic system included the following modules: HPG-3400RS binary pump, vacuum degasser, TCC-3000RS heated column compartment, and WTS-3000RS autosampler equipped with a 25 μL loop and DAD-3000 detector. A Phenomenex Kinetex C18 EVO column (3.0 \times 150 mm/2.6 μm ; 100 \AA) was chosen as the stationary phase. The temperature in the column thermostat was set to 27 $^{\circ}\text{C}$. The chromatographic analyses were performed by the reverse phase gradient elution method with mobile phase A: 0.1% (v/v) formic acid in ultrapure water of ASTM I type (resistance 18.2 $\text{M}\Omega \times \text{cm}$ at 25 $^{\circ}\text{C}$) prepared with a Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF apparatus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and mobile phase B: 0.1% (v/v) formic acid in LC-MS grade acetonitrile. For the elution, a simple linear gradient program mixing ultrapure water (MPA) and acetonitrile (MPB), both acidified with 0.1% (v/v) of formic acid, was developed: 0–1.0 min 10% MPB, 1.0–4.0 min 10–100% MPB, 4.0–5.0 min 100% MPB, 5.0–5.0 min 100–10% MPB, 5.0–7.5 min 10% MPB. The flow-rate of the mobile phase was set to 0.4 mL/min and the injection volume to 5 μL . In MS, heated electro-spray ionization (HESI) was utilized (setting: sheath gas flow rate 55, aux gas flow rate 15, sweep gas flow rate 3, spray voltage 3.5 kV, capillary temperature 220 $^{\circ}\text{C}$, aux gas temperature 220 $^{\circ}\text{C}$, S-lens RF level 50). Ions were monitored in the range of 150–1000 m/z in positive mode with the resolution set to 140,000. The chromatograms and mass spectra were processed on Chromeleon 6.80 and Xcalibur 3.0.63 software, respectively. The substances were identified according to their high-resolution mass to charge ratio. In order to determine the unknown concentrations of the studied compounds in the donor and acceptor solutions, a calibration measurement spanning the range of 5–100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was carried out. The linearity of calibration across its 5 points range was confirmed with $R^2 > 0.9910$ for all compounds.

5. Results and calculations

In the first stage of method development, we selected 25 reference drugs, with varying BBB permeability, diverse structure and lipophilicity, neutral or predominantly unionized (also few zwitterions with a summary charge equal to 0) in analysis conditions (pH 7.4). For these compounds, the influence of the electric field on their migration times was minimized and separation was mainly dependent on the interaction with liposomes. During method optimization, separation conditions

were established in order to test all 25 references, preserving a reasonable time for their migration in the capillary. At first, we used a capillary with 50 μm of internal diameter and POPC/PS liposomes (80:20 mol%). In the preliminary research, the separation time was best for 20 kV voltage analysis, however, it was still acceptable for an experiment conducted under the voltage of 10 kV. Therefore, we decided to perform separation of all references under 20 kV and 10 kV voltage (other parameters of analysis were unchanged) and compare obtained correlation coefficients in both conditions. After coating the capillary with POPC/PS liposomes, 25 compounds were analyzed and their log k parameters were calculated on the basis of their migration times, according to the Equation (2),

$$\log k = \log \frac{t_R - t_{EOF}}{t_{EOF}} \quad (2)$$

where t_R , t_{EOF} are the migration times (min) of the solute and the EOF marker (methanol), respectively.

The retention factor (k) is defined as the ratio of the total number of moles of analyte in the stationary and aqueous phase [52].

Equation (2) is a simplification of Equation (3) used by Terabe et al. [52] in micellar electrokinetic chromatography,

$$\log k = \log \frac{t_R - t_{EOF}}{t_{EOF} (1 - t_R/t_{MC})} \quad (3)$$

where t_{MC} is the migration time of micelles *i.e.* pseudo-stationary phase. In the developed method liposomes, a stationary phase analogous to micelles, are attached to the capillary wall, so they never exit the capillary and their migration time becomes infinite ($t_{MC} \rightarrow \infty$).

Determined log k parameters (Table 1) were used for quantitative and qualitative purposes. In terms of qualitative permeability assessment, references can be classified as easy brain penetrators CNS(+) and poor brain penetrators CNS(-), according to their log k values. Subsequently, approximate ranges of log k for CNS permeable and non-permeable drugs were established on the basis of their literature CNS(+)/CNS(-) classification [4,53–64]. References with log k values lower than -1.84 or higher than -1.61 (analysis under 20 kV voltage, with POPC/PS coating) were predominantly (75%) correctly assessed as CNS(-) or CNS(+) agents, respectively (Table 2). In the case of the PAMPA-BBB analogical log P_e ranges, there are 77% of the correct assessments of the CNS(+) and CNS(-) compounds; both CEC and PAMPA-BBB analyses are based on the experimentally obtained log k and log P_e values.

From the quantitative point of view, the model needs to be evaluated for its predictive ability. For this purpose, log k parameters were compared with experimental literature log BB data [65–69] (*in vivo*

Table 1
Log k and log P_e values determined by experimental methods (CEC and PAMPA-BBB, respectively). Log BB values are experimental data retrieved from the literature^[65–69].

reference	CEC POPC/PS ^a		CEC PBL ^b	log BB ^d	PAMPA-BBB
	log k ^c ± SD		log k ^c ± SD	log k ^c ± SD	log P _e
	at 20 kV	at 10 kV	at 20 kV		
acetaminophen	-1.603 ± 0.001	-1.573 ± 0.005	-1.618 ± 0.010	-0.31	-6.081
alprazolam	-1.601 ± 0.008	-1.557 ± 0.002	-1.639 ± 0.020	0.044	-4.968
aminophenazone	-1.715 ± 0.069	-1.810 ± 0.013	-1.815 ± 0.003	0	-4.822
antipyrine	-1.635 ± 0.022	-1.597 ± 0.001	-1.700 ± 0.009	-0.097	-5.889
barbital	-0.656 ± 0.016	-0.639 ± 0.031	-0.696 ± 0.001	-0.25	-6.921
caffeine	-1.845 ± 0.026	-1.705 ± 0.008	-1.735 ± 0.010	-0.055	-5.405
carbamazepine	-1.495 ± 0.002	-1.525 ± 0.001	-1.535 ± 0.003	-0.14	-4.894
cetirizine	-1.020 ± 0.001	-1.086 ± 0.006	-1.041 ± 0.004	-1.3	-5.524
diazepam	-1.476 ± 0.087	-1.586 ± 0.014	-1.524 ± 0.008	0.52	-4.710
digoxin	-2.209 ± 0.070	-2.319 ± 0.063	-2.265 ± 0.035	-1.23	-7.097
feofenadine	-2.208 ± 0.104	-2.089 ± 0.093	nd ^e	-0.98	-4.987
fluconazole	-1.701 ± 0.020	-1.648 ± 0.005	-1.645 ± 0.028	-0.22	-5.241
hexobarbital	-1.058 ± 0.001	-1.055 ± 0.003	-1.075 ± 0.004	0.1	-4.655
hydrocortisone	-1.610 ± 0.011	-1.702 ± 0.029	-1.543 ± 0.029	-0.9	-5.400
lamotrigine	-1.527 ± 0.010	-1.548 ± 0.017	-1.481 ± 0.004	0.48	-5.106
levodopa	-1.458 ± 0.009	-1.442 ± 0.011	-1.474 ± 0.008	-0.77	-5.325
midazolam	-1.550 ± 0.013	-1.451 ± 0.018	-1.600 ± 0.008	0.36	-4.695
norfloxacin	-2.193 ± 0.032	-2.032 ± 0.051	-2.350 ± 0.031	-1	-6.348
omeprazole	-1.387 ± 0.001	-1.395 ± 0.006	-1.421 ± 0.004	-0.82	-5.102
oxazepam	-1.080 ± 0.057	-1.390 ± 0.040	-1.526 ± 0.005	0.61	-4.659
phenytoin	-0.924 ± 0.005	-0.906 ± 0.011	-0.965 ± 0.015	-0.04	-5.043
progesterone	-1.283 ± 0.128	-1.406 ± 0.018	-1.438 ± 0.004	0.2	-5.075
thebromine	-1.631 ± 0.001	-1.701 ± 0.002	-1.700 ± 0.012	-0.28	-5.996
theophylline	-1.231 ± 0.004	-1.229 ± 0.003	-1.307 ± 0.001	-0.29	-5.719
zolpidem	-2.169 ± 0.024	-2.122 ± 0.037	nd	-0.54	-4.695

^a Capillary with 50 μm internal diameter, coated with POPC/PS liposomes (80:20 mol%).

^b Capillary with 50 μm internal diameter, coated with porcine PBL Extract liposomes.

^c Means of three experiments.

^d *In vivo* measurements from rats.

^e Not defined due to overlapping peaks of methanol and reference.

measurements obtained from rats), and with log P_e values obtained experimentally in the PAMPA-BBB assay. All data are collected in Table 1.

The P_e value is expressed in [10⁻⁶cm × s⁻¹] units and describes the penetration rate of the compound across the membrane. The log P_e parameters were calculated, according to Equation (1).

The obtained log k values and permeability parameters were plotted to give the calibration curves described by linear equations Equation (4) and Equation (5),

$$\log BB = a \log k + b \quad (4)$$

$$\log P_e = c \log k + d \quad (5)$$

where *a*, *c* represent the slopes and *b*, *d* are the intercepts of the calibration curves, respectively.

Correlation coefficients were determined for both 20 kV and 10 kV voltage separations. In the case of log k and log BB correlation (Fig. 4A), four compounds (caffeine, levodopa, cetirizine, and barbital) were excluded, as their log BB values were reported to be affected by processes other than only passive diffusion [4,70–75]. Linear regression for log k and log P_e parameters (Fig. 4B) was prepared on the basis of data for 22 compounds, with 3 more excluded from the final analysis (barbital, feofenadine, and zolpidem) as outliers (see discussion section).

To compare PAMPA-BBB reference experimental results with *in vivo* permeability data, correlation analysis was prepared for log P_e and log BB parameters (Fig. 5). The same 4 drugs were excluded from linear regression as in case of analogical correlation of CEC retention factors and log BB (caffeine, levodopa, cetirizine, and barbital). The obtained R² coefficient was comparable to those calculated for log k and log BB

parameters (Fig. 4A). Log k values obtained for 20 kV CEC analysis correlated even better with *in vivo* data than log P_e values from reference method (R² = 0.4258 versus R² = 0.3678, for CEC and PAMPA-BBB, respectively).

Total electrophoretic mobilities of reference compounds were also calculated (Fig. 6). The electrophoretic mobility μ_{tot} of an analyte is defined as the sum of the electroosmotic mobility in the capillary μ_{eof} and the electrophoretic mobility of the analyte itself μ_{ep} (Equation (6)).

$$\mu_{tot} = \mu_{ep} + \mu_{eof} \quad (6)$$

The total electrophoretic mobility μ_{tot} was obtained using Equation (7),

$$\mu_{tot} = \frac{V_{tot}}{E} [\text{cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}] \quad (7)$$

where V_{tot} is electrophoretic velocity [cm × s⁻¹] obtained by dividing the effective capillary length by the migration time of the analyte, and E is the magnitude of the applied electrical field, calculated by dividing the applied voltage by total capillary length [V × cm⁻¹].

The electroosmotic mobility μ_{eof} (marked by methanol) was calculated analogically to total electrophoretic mobility, using Equation (7). The μ_{eof} parameter was used for assessment of the effectiveness of the capillary coating process (Table 3).

We also tested the separation of reference compounds in a capillary of 20 μm of internal diameter, with a coating composed of POPC/PS (80:20 mol%) liposomes. The liposomal layer was stable, as suppressed EOF was observed (Table 3), but no favorable changes in the separation of tested references were obtained. Unexpectedly, log k parameters of tested drugs were lower, indicating weaker interaction of those

Table 2
CNS(+)/CNS(-) classification of 25 references, based on literature data and *in vitro* experimental permeability parameters.

	acetaminophen	alprazolam	aminophenazone	antipyrine	barbital	caffeine	carbamazepine	cetirizine	diazepam	digoxin	fenofenemidine	fluconazole	
CNS + / - classification ^a	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	
CEC ^b	+	+	±	±	+	-	+	+	+	-	-	+	
PAMPA-BBB ^c	-	+	+	-	-	±	+	±	+	-	+	+	
	hexobarbital	hydrocortisone	lamotrigine	levodopa	mizolam	norflouxacin	omeprazole	oxazepam	phenytoin	progesterone	theobromine	theophylline	zolpidem
CNS + / - classification ^a	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	±	-	+
CEC ^b	+	±	+	+	+	-	+	+	+	±	±	+	+
PAMPA-BBB ^c	+	±	+	+	+	-	+	+	+	±	-	-	+

^a Literature data^[453-461].

^b Preliminary results; log k approximate ranges: CNS(+) log k > -1.61; CNS(-) log k < -1.84; uncertain data marked as CNS(±) for -1.84 < log k < -1.61; analysis under voltage of 20 kV, in a 50 μm internal diameter capillary, with POPC/PS (80:20 mol%) liposomal coating.

^c Log P_e ranges: CNS(+) log P_e > -5.398; CNS(-) log P_e < -5.699; CNS(±) -5.699 < log P_e < -5.398.

compounds with the liposomal coating (Table 4). We compared log k parameters calculated for 5 reference compounds according to their migration times in capillaries with 50 μm and 20 μm of internal diameter, under an applied voltage of 20 kV. As the obtained correlation coefficient was very high (R² = 0.9962), we did not conduct the analysis for all 25 references. Less effective separation of tested compounds was probably caused by the worse quality of the obtained liposomal layer. The type and effectiveness of this coating require verification by additional studies (e.g., QCM technique).

In the course of method optimization, liposomes prepared from porcine PBL Extract were also utilized as a coating material for a capillary with 50 μm internal diameter. The coating was stable, and the EOF was suppressed, however not as well as in the case of POPC/PS vesicles (Table 3). Subsequently, the separation was less effective, as the interaction between the tested references and the covered capillary wall was in general slightly weaker in comparison to a POPC/PS liposomal coating (lower log k parameters obtained; comparison between 50 μm capillaries, separation at 20 kV voltage) (Table 1). The correlation coefficients calculated from linear regressions of log k and log BB as well as log k and log P_e parameters were also less satisfactory than the analogical ones obtained for POPC/PS coating (R² = 0.2601, F = 5.98, p = 0.0257, n = 19; for log k and log BB analysis and R² = 0.3447, F = 10.52, p = 0.0041, n = 22; for plotted log k and log P_e values). The PBL liposomal coating type and quality also need to be verified by additional studies (QCM or other), as well as the size of the PBL liposomes and their surface charge (e.g. zeta potential).

6. Discussion

Optimization of the operating conditions was the critical step for the new CEC method development. Many parameters were tested in order to obtain a satisfactory compounds' separation, simultaneously preserving a reasonable migration time for the tested references and mimicking, as far as possible, physiological conditions during analysis. As a result, we successfully covered the capillary with the liposomal layer, which enabled us to separate all 25 reference compounds and calculate their log k parameters based on their migration times. We tested two different liposome compositions, preparing LUVs composed of POPC/PS (80:20 mol%, according to literature data [35]) and vesicles composed of porcine PBL Extract. Both types of liposomes were able to cover the inner capillary wall, and the effectiveness of the created layer was confirmed by reduced EOF. However, the liposomes composed of POPC and PS phospholipids seemed to be more suitable for the developed method, due to their stronger interaction with the tested compounds in the capillary. Also, the composition of POPC/PS is constant, in contrast to brain lipid vesicles, which contain approximately 31% of unknown lipids. During method optimization, we used POPC/PS liposomes as a coating material for capillaries of 50 μm and 20 μm internal diameter. As the liposomal LUV coating has a thickness of only about 70 nm [38] (SVL type layer), it is expected that the narrower the capillary is, the better should be the interaction between liposomes and tested compounds. That was not confirmed by the study results. The log k parameters of tested drugs were lower in the 20 μm capillary (Table 4), so the compounds migrated with higher velocity toward the cathode, although EOF was more suppressed in comparison to the 50 μm capillary (Table 3). This was probably due to the poor quality of the obtained liposomal layer. Therefore, we decided to conduct the analysis in a capillary with 50 μm internal diameter, testing if the change of applied voltage enabled an improvement in the separation parameters. The voltage of 20 kV was the best to combine the short migration time of references with their satisfactory separation in the capillary. However, the time of separation was no longer than 14 min, even under the application of 10 kV voltage. That is why we decided to use data received under voltages of 20 kV and 10 kV in the presented analysis, to compare correlation coefficients obtained in both conditions. Initially, we plotted the received experimental log k parameters

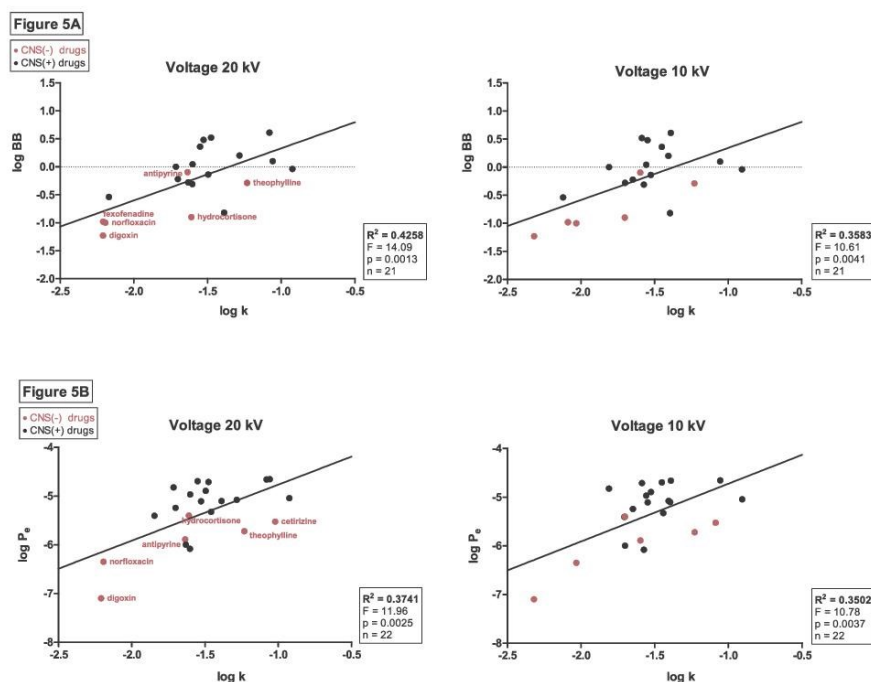


Fig. 4. Calibration curves obtained by linear regression for the reference compounds (Fig. 4A). Plotted values: $\log k$ and $\log BB$ parameters (Fig. 4B); Plotted values: $\log k$ and $\log P_o$ parameters. Electrophoretic analysis in POPC/PS (80:20 mol%) coated capillary with 50 μm internal diameter, under applied voltage of 20 kV and 10 kV; drugs defined as BBB non-permeable (CNS(-)) are marked in pink. Drugs with good BBB permeability (CNS(+)) are marked in black. CNS permeability classification based on literature data^{4,53–64}. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

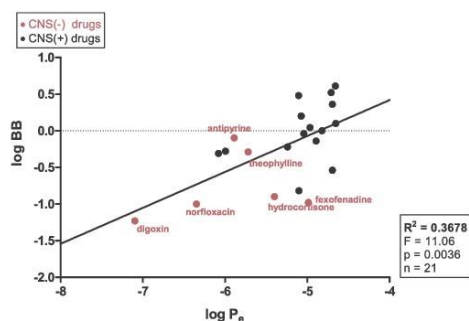


Fig. 5. Comparison of permeability data from PAMPA-BBB method and *in vivo* experiments from rats. Plotted values: $\log P_o$ and $\log BB$. Drugs defined as BBB non-permeable (CNS(-)) are marked in pink. Drugs with good BBB permeability (CNS(+)) are marked in black. CNS permeability classification based on literature data^{4,53–64}. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

with $\log BB$ values obtained *in vivo*. The correlation between $\log k$ and $\log BB$ parameters was acceptable only when 4 references (caffeine, levodopa, cetirizine, and barbital) were excluded from the analysis, and better for separation under 20 kV voltage. This is in accordance with the literature data [76], recommending caution while correlating $\log BB$ values with *in vitro* obtained passive permeability parameters. Brain and blood drug concentration ratio measured *in vivo* in rats in a steady-state takes into account drug distribution through BBB by both passive diffusion and facilitated (influx and/or efflux) transport. The $\log BB$ value is also affected by other processes such as drug metabolism or plasma protein binding. Thus obtained CEC $\log k$ values should be correlated with $\log BB$ data only for compounds displaying a mainly passive BBB penetration route. Similar problems were noticed during the PAMPA-BBB method development. Reference drugs were mis-classified as false CNS(+) if they underwent rapid metabolism in systemic circulation or efflux by the P-gp protein, and as false CNS(-) if they were transported into the brain by both passive diffusion and carrier-mediated transport. Among the CEC tested references caffeine and levodopa undergo facilitated brain uptake [4,77] (in the case of levodopa, also opposite Na^+ -dependent transport from the brain to the bloodstream is reported [71]) and their permeability data decrease correlation significance (Fig. 7). In consequence, we decided to exclude them from the prepared $\log k$ and $\log BB$ calibration curve. Another issue concerns references which are easily permeable across BBB through passive diffusion but are eliminated from CNS by efflux

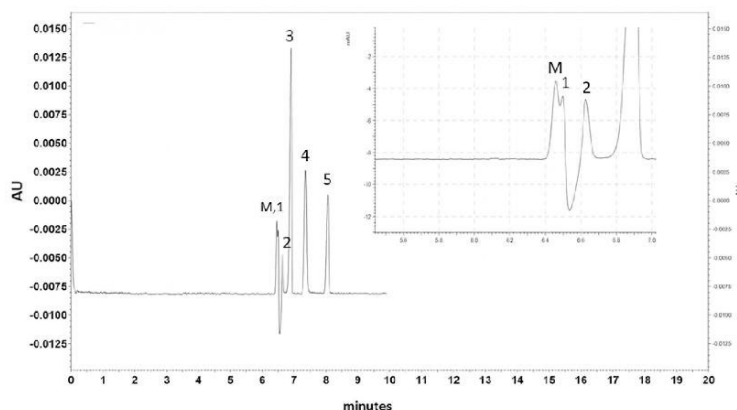


Fig. 6. Electropherogram presenting the separation of mixture of five reference drugs i.e. (1) theobromine ($\mu_{\text{EOF}} = 3.71 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$), (2) hydrocortisone ($\mu_{\text{EOF}} = 3.64 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$), (3) theophylline ($\mu_{\text{EOF}} = 3.49 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$), (4) phenytoin ($\mu_{\text{EOF}} = 3.28 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) and (5) barbital ($\mu_{\text{EOF}} = 2.99 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$); methanol (the EOF marker) peak is marked as M. Experimental conditions: 59.1 cm capillary (49 cm to detector window) with 50 μm internal diameter; POPC/PS liposome coating; temperature: 25 °C, separation buffer: 40 mM HEPES at pH 7.4; sample: 1:9 diluted methanol stock solution of compound (1.5 mg/mL) in separation buffer; applied voltage: +20 kV; direct UV detection at 220 nm.

transporters. According to the literature data [72,73], cetirizine undergoes efflux elimination, P-gp and not P-gp mediated. Its log BB parameter value determined *in vivo* is low (log BB = -1.3 [69]), indicating a low CNS drug concentration in a steady state. However, cetirizine is reported to be able to passively cross BBB and induce weak CNS related adverse effects (sedation) [73]. The *in silico* calculated drug log BB value, based on Abraham descriptors [67], is much higher (log BB = 0.1 [54]). The log k parameter, determined in the CEC method was also relatively high (log k = -1.01; Table 1), indicating the compound's interaction with the liposomal coating. As a result, the permeation was overestimated using the CEC method, and the drug was an outlier in the linear regression analysis (Fig. 7). Among the tested references, fexofenadine, digoxin, and norfloxacin are also eliminated from the brain by efflux transporters. Fexofenadine and digoxin undergo P-gp and non-P-gp mediated BBB efflux [72,78], but uptake transport is also involved in their distribution between blood and brain [61,79]. As a result, the correlation between fexofenadine and digoxin log k and log BB values was satisfactory in terms of the presented linear regression analysis (20 kV). However, for norfloxacin, a substrate for P-gp and non-P-gp efflux transporters [78], no active uptake mechanism has been reported. Nevertheless, the drug displayed weak *in vitro* interaction with the liposomal layer, probably due to its physicochemical properties (i.e. log P = -1.03), that also determine its poor *in vivo* membrane permeability, and it was not excluded from the correlation of log k and log BB parameters.

Log BB as a composite parameter also depends on factors other than passive and active transport. These are rapid drug metabolism, low partitioning to the brain tissue, sink effect of cerebrospinal fluid and high plasma protein binding. The low log BB value may be a signal of extensive drug binding to serum albumin or other carrier proteins in

Table 4

Log k values of selected reference compounds, calculated on the basis of their migration times in capillary with 50 μm and 20 μm internal diameter, with POPC/PS liposomal coating, under applied voltage of 20 kV.

Compound	log k ^a \pm SD for capillary/coating	
	50 μm POPC/PS ^b	20 μm POPC/PS ^b
barbital	-0.656 \pm 0.016	-0.815 \pm 0.010
diazepam	-1.476 \pm 0.087	-1.768 \pm 0.010
phenytoin	-0.924 \pm 0.005	-1.074 \pm 0.004
theophylline	-1.231 \pm 0.004	-1.484 \pm 0.001
theobromine	-1.631 \pm 0.002	-1.898 \pm 0.003

^a Mean of three experiments.

^b Capillary coated with POPC/PS liposomes (80:20 mol%).

blood plasma [74]; on the other hand, the unbound compound's fraction may still be able to cross BBB and cause the desired pharmacological effect. Among the analyzed references, barbital displays low log BB value (log BB = -0.25), and as the acidic drug, it is reported to be bound by serum albumin [75]. Despite this fact, barbital is classified as CNS(+) agent [59], penetrating the brain by passive diffusion. Its determined CEC log k parameter was high (Table 1); when plotted with its low log BB value, the correlation coefficient was significantly weaker ($R^2 = 0.3206$, $n = 22$ and $R^2 = 0.4258$, $n = 21$; with and without barbital, respectively, the voltage of 20 kV; Fig. 7). Subsequently, barbital was excluded from the correlation analysis.

The same references (caffeine, levodopa, cetirizine, barbital) were excluded from linear regression prepared for PAMPA-BBB log P_e experimental data and log BB values (Fig. 5). Analogically to CEC method,

Table 3

Suppression of the electroosmotic flow in a coated capillary with 50 and 20 μm internal diameter. Relative standard deviation (RSD) [%] indicates the EOF stability. Applied voltage: 20 kV.

Capillary/coating	50 μm uncoated	50 μm POPC/PS ^a	50 μm PBL ^b	20 μm uncoated	20 μm POPC/PS ^a
$\mu_{\text{EOF}} \times 10^{-8} [\text{m}^2 \times \text{s}^{-1} \times \text{V}^{-1}]$	4.87	4.11	4.26	5.69	4.87
RSD [%]	7.18	8.40	8.61	0.41	2.75
number of measurements	45	100	70	3	15

^a Capillary coated with POPC/PS liposomes (80:20 mol%).

^b Capillary coated with porcine PBL Extract liposomes; the PBL liposomal coating quality as well as the size of the PBL liposomes and their surface charge need to be verified by additional studies.

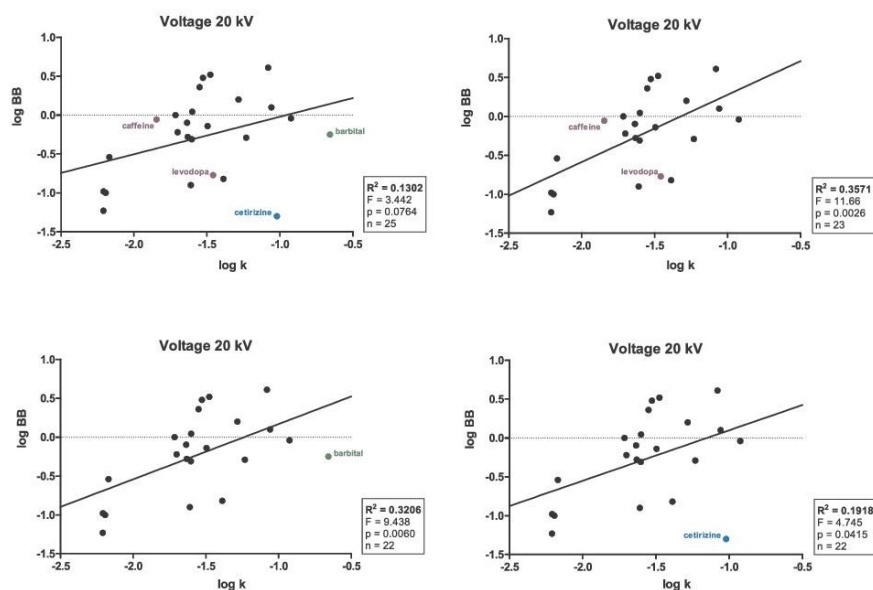


Fig. 7. Correlation coefficient analysis with four references excluded from linear regression presented in Fig. 4A, due to other than passive diffusion processes, affecting their log BB values. Cetirizine (marked in blue) is an outlier in the presented analysis. Caffeine and levodopa (both marked in violet), along with barbitol (marked in green) diminish the significance of the correlation; capillary with 50 μm of internal diameter, POPC/PS (80:20 mol%) liposome coating. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

PAMPA-BBB data seemed not to correlate very well with log BB values for compounds with other than passive diffusion processes involved in their permeation ($R^2 = 0.2472$, $F = 7.552$, $p = 0.0115$ for all 25 analyzed drugs, and $R^2 = 0.3678$, $F = 11.06$, $p = 0.0036$, for 21 references).

Finally, we decided to compare log k and log P_e parameters determined by the passive diffusion models: CEC and PAMPA-BBB, respectively. Correlation coefficients were calculated (Fig. 4B); however, 3 compounds were classified as outliers and excluded from the analysis. Obtained R^2 values were comparable to those from corresponding log k and log BB regressions (Fig. 4A). It is worth emphasizing, that the PAMPA-BBB method gives information about the penetration rate of tested compounds, which are classified as CNS(+) or CNS(-) based on their P_e values. In turn, using the CEC method we can assess molecules' affinity to the phospholipid bilayer rather than their permeability rate. Low lipid-soluble drugs penetrate slowly through the membrane; still, they display interference with the lipid bilayer. Usually, they are also able to penetrate CNS and induce pharmacological effects. Such compounds may be characterized by low P_e values that do not correlate well with corresponding log k parameters. That was the reason why barbitol was an outlier in the presented log k and log P_e correlation analysis. Barbitol is a known CNS(+) agent but is reported to penetrate slowly across the membrane [59]. Indeed, its experimental log P_e value is more like this for CNS(-) drugs. The CEC method gives a better prediction of its CNS affinity. Determined log k parameter is high, indicating the compound's interaction with the liposomal layer. Hexobarbital displays a different permeability profile, as it is characterized by higher lipid solubility and penetrates the brain very quickly [59]. In the case of this drug, log k and log P_e values correlate well. Another outlier, zolpidem, also penetrates rapidly across the membrane [80] and, in turn, is better assessed by the PAMPA-BBB assay. The last one of the excluded drugs,

feofenadine, undergoes carrier-mediated influx and efflux transport, so it is hard to assess drug's permeability, using both "passive methods". The PAMPA-BBB assay classifies feofenadine as a CNS(+) compound, while the determined log k value indicates its low affinity to the biological membrane and in fact, the drug's CNS penetration is very limited. The results obtained for the excluded drugs well demonstrate the limitations of *in vitro* techniques for BBB penetration estimation.

As the calculated correlation coefficients for the presented linear regressions of log k and log BB/log P_e parameters are based on experimental data of a small set of 25 drugs, it is hard and too early to indicate clear ranges of log k values for CNS(+) and CNS(-) drugs, similar to those for log P_e in the PAMPA-BBB assay. Nevertheless, even at the early stage of method development, CEC proved to have the potential to be a quick and useful tool for permeability prediction of compounds. References with log k < -1.84 or log k > -1.61 (analysis under 20 kV voltage, with POPC/PS coating) are predominantly correctly assessed as CNS(-) or CNS(+) agents, respectively (Table 2). From a qualitative point of view, the percentage of correct predictions is comparable to the PAMPA-BBB assay data, as well as to some other *in vitro* separation methods proposed for BBB permeability assessment [11,12,17].

7. Conclusions

25 marketed drugs were used as references for the new, permeability prediction CEC method development. The best parameters for separation of reference compounds were obtained in the capillary of 50 μm internal diameter, coated with a POPC/PS liposome (80:20 mol %) layer, under the applied voltage of 20 kV. Based on drug migration times in the capillary, their log k parameters were calculated and then correlated with experimental log BB and log P_e values. The final log k

and log BB linear regression was based on 21 reference data with $R^2 = 0.4258$, for 20 kV voltage. The obtained R^2 value was better than that calculated from the corresponding reference correlation of PAMPA-BBB log P_e parameters and log BB *in vivo* data ($R^2 = 0.3678$, $n = 21$). The received correlation coefficients indicate obvious limitations of non-cell based *in vitro* methods. Due to their simplifications, no such technique will ever correlate very well with *in vivo* conditions. Nevertheless, for screening purposes, the presented CEC tool is comparable to the PAMPA-BBB method widely used in early drug discovery. For most references, CNS(+) / CNS(-) preliminary predictions are similar in the case of both methods and also in agreement with drugs' permeability literature classification. The presented model may be further validated with the extent number of compounds, including molecules predominantly charged in pH 7.4.

To conclude, the new method proves to have the potential to work well as a simple tool for early BBB permeability assessment of research compounds. It is an innovative, fast and relatively cheap alternative to the PAMPA-BBB technique. Also, it utilizes a liposomal coating of bilayer structure, closely mimicking natural phospholipid bilayers of BBB. Moreover, it preserves the main advantages of the other electrophoretic strategies, as well as the chromatographic separation models based on LC. In our opinion, it is worth following up on this method based on its potential application at the early drug discovery stage.

CREdiT authorship contribution statement

Justyna Godyń: Conceptualization, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Dominika Gućwa:** Investigation. **Tereza Kobrlova:** Investigation. **Martin Novak:** Investigation. **Ondrej Soukup:** Investigation, Writing - original draft. **Barbara Malawska:** Writing - review & editing. **Marek Bajda:** Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was partially supported by the National Science Centre, Poland (grant no. UMO-2016/21/B/NZ7/01744), Czech Health Research Council (grant no. 17-32801A), the Ministry of Education, Youth and Sports of Czech Republic (project ERDF IT4N no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/18_069/001/0054) and the project SVV 260 401.

References

- [1] J. van Asperen, U. Mayer, O. van Tellingen, J.H. Beijnen, The functional role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier, *J. Pharmacol. Sci.* 86 (1997) 881–884, <https://doi.org/10.1021/js9701364>.
- [2] A. Schinkel, P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 36 (1999) 179–194, [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00085-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00085-4).
- [3] R. Nau, F. Sorgel, H. Eiffert, Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections, *Clin. Microbiol. Rev.* 23 (2010) 858–883, <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-10>.
- [4] L. Di, E.H. Kerns, K. Fan, O.J. McConnell, G.T. Carter, High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier, *Eur. J. Med. Chem.* 38 (2003) 223–232, [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(03)00012-6).
- [5] K. Ciura, S. Dziomba, Application of separation methods for *in vitro* prediction of blood-brain barrier permeability—the state of the art, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 177 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112891>.
- [6] A. Espada, M. Molina-Martin, Capillary electrophoresis and small molecule drug discovery: a perfect match? *Drug Discov. Today* 17 (2012) 396–404, <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.02.008>.

- [7] H. Wan, M. Åhman, A.G. Holmén, Relationship between brain tissue partitioning and microemulsion retention factors of CNS drugs, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 1693–1700, <https://doi.org/10.1021/jm801441s>.
- [8] Y. Wang, J. Sun, H. Liu, Z. He, Rapidly profiling blood-brain barrier penetration with liposome EKC, *Electrophoresis* 28 (2007) 2391–2395, <https://doi.org/10.1002/epts.200600631>.
- [9] K. Ciura, H. Kapica, S. Dziomba, P. Kawczak, M. Belka, T. Bączek, Biopartitioning micellar electrokinetic chromatography – concept study of cationic analytes, *Microchem. J.* 154 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104518>.
- [10] A.W. Sobańska, K. Wanat, E. Brzezińska, Prediction of the blood-brain barrier permeability using RP-18 thin layer chromatography, *Open Chem* 17 (2019) 43–56, <https://doi.org/10.1515/chem-2019-0005>.
- [11] A.W. Sobańska, A. Hekner, E. Brzezińska, RP-18 HPLC analysis of drugs' ability to cross the blood-brain barrier, *J. Chem.* 2019 (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1155/2019/5795402>.
- [12] R. Doležal, N. Karásková, K. Musil, M. Novák, N.V. Maltsevskaya, D. Malinák, K. Kolář, O. Soukup, K. Kuča, J. Žďáravý Karasová, Characterization of the penetration of the blood-brain barrier by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a stationary phase with an immobilized artificial membrane, *Anal. Lett.* 51 (2018) 2401–2414, <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1424175>.
- [13] G. Russo, L. Grumetto, R. Szucs, F. Barbato, F. Lynen, Screening therapeutics according to their uptake across the blood-brain barrier: a high throughput method based on immobilized artificial membrane liquid chromatography-diode-array-detection coupled to electrospray-time-of-flight mass spectrometry, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 127 (2018) 72–84, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.004>.
- [14] X. Subirats, L. Muñoz-Pascual, M.H. Abraham, M. Rosés, Revisiting blood-brain barrier: a chromatographic approach, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 145 (2017) 98–109, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.027>.
- [15] J. Liu, J. Sun, Y. Wang, X. Liu, Y. Sun, H. Xu, Z. He, Characterization of microemulsion liquid chromatography systems by solvation parameter model and comparison with other physicochemical and biological processes, *J. Chromatogr., A* 1164 (2007) 129–138, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.066>.
- [16] J. Liu, J. Sun, X. Sui, Y. Wang, Y. Hou, Z. He, Predicting blood-brain barrier penetration of drugs by microemulsion liquid chromatography with corrected retention factor, *J. Chromatogr., A* 1198–1199 (2008) 164–172, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.065>.
- [17] L. Escuder-Gilabert, M. Molero-Monfort, R.M. Villanueva-Camañas, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, Potential of biopartitioning micellar chromatography as an *in vitro* technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 807 (2004) 193–201, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.004>.
- [18] G. Russo, F. Barbato, L. Grumetto, L. Philippe, F. Lynen, G.H. Goetz, Entry of therapeutics into the brain: influence of exposed polarity calculated in silico and measured *in vitro* by supercritical fluid chromatography, *Int. J. Pharm.* 560 (2019) 294–305, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.008>.
- [19] R.B. van Breemen, Y. Li, Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption, *Expet Opin. Drug Metabol. Toxicol.* 1 (2005) 175–185, <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>.
- [20] É. Hellinger, S. Veszelka, A.E. Tóth, F. Walter, Á. Kittel, M.L. Bakk, K. Tihanyi, V. Háda, S. Nakagawa, T. Dinh Ha Duy, M. Niwa, M.A. Deli, M. Vastag, Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 82 (2012) 340–351, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.07.020>.
- [21] K.L. Audus, R.T. Borchardt, Transport of Macromolecules across the Capillary Endothelium, Springer, Berlin, Heidelberg, 1991, pp. 43–70, https://doi.org/10.1007/978-3-642-75862-1_3.
- [22] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary, *Anal. Chem.* 57 (1985) 834–841, <https://doi.org/10.1021/ac00281a014>.
- [23] D. Panek, A. Więckowska, T. Wichur, M. Bajda, J. Godyń, J. Jończyk, K. Mika, J. Janockova, O. Soukup, D. Knez, J. Korabecny, S. Gobec, B. Malawska, Design, synthesis and biological evaluation of new phtalimide and saccharin derivatives with alicyclic amines targeting cholinesterases, beta-secretase and amyloid beta aggregation, *Eur. J. Med. Chem.* 125 (2017) 676–695, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.078>.
- [24] M. Hebda, M. Bajda, A. Więckowska, N. Szałaj, A. Pasieka, D. Panek, J. Godyń, T. Wichur, D. Knez, S. Gobec, B. Malawska, Synthesis, molecular modelling and biological evaluation of novel heterodimeric, multiple ligands targeting cholinesterases and amyloid beta, *Molecules* 21 (2016) 410, <https://doi.org/10.3390/molecules21040410>.
- [25] D. Panek, A. Więckowska, J. Jończyk, J. Godyń, M. Bajda, T. Wichur, A. Pasieka, D. Knez, A. Piłlar, J. Korabecny, O. Soukup, V. Sepsova, R. Sabaté, J. Kos, S. Gobec, B. Malawska, Design, synthesis, and biological evaluation of 1-Benzylamino-2-hydroxyalkyl derivatives as new potential disease-modifying multifunctional anti-alzheimer's agents, *ACS Chem. Neurosci.* 9 (2018) 1074–1094, <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.7b00461>.
- [26] M. Kansy, F. Šemmer, K. Gubernator, Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 1007–1010, <https://doi.org/10.1021/jm970530e>.

- [27] A.D. Bangham, Liposomes: realizing their promise, *hosp. In Pract.* 27 (1992) 51–62, <https://doi.org/10.1080/21548331.1992.11705537>.
- [28] D. Bitounis, R. Fanciullino, A. Iliadis, J. Ciccolini, Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept, *Int. Sch. Res. Netw. ISRN Pharm.* (2012), <https://doi.org/10.5402/2012/738432>.
- [29] J.M. Gullifé, N.E. Beryla, C.A. Lucy, Phospholipid bilayer coatings for the separation of proteins in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 74 (2002) 776–783, <https://doi.org/10.1021/AC015627U>.
- [30] S.K. Wiedmer, P. Kulovesi, M.-L. Riekkola, Liposome electrokinetic capillary chromatography in the study of analyte-phospholipid membrane interactions. Application to pesticides and related compounds, *J. Separ. Sci.* 31 (2008) 2714–2721, <https://doi.org/10.1002/jssc.200800239>.
- [31] Y. Zhang, R. Zhang, S. Hjertén, P. Lundahl, Liposome capillary electrophoresis for analysis of interactions between lipid bilayers and solutes, *Electrophoresis* 16 (1995) 1519–1523, <https://doi.org/10.1002/elps.11501601251>.
- [32] X. Liu, B. Testa, A. Fahr, Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation, *Pharm. Res. (N. Y.)* 28 (2011) 962–977, <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0303-7>.
- [33] S.K. Wiedmer, R. Shimmo, Liposomes in capillary electromigration techniques, *Electrophoresis* 30 (2009), <https://doi.org/10.1002/elps.200900061> S240–S257.
- [34] E. Ornskov, J. Gottfried, M. Erickson, S. Folestad, Experimental modelling of drug membrane permeability by capillary electrophoresis using liposomes, micelles and microemulsions, *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (2005) 435–442, <https://doi.org/10.1211/00223575055867>.
- [35] J.T. Hautala, M. V. Lindén, S.K. Wiedmer, S.J. Rytönen, M.J. Säily, P.K.J. Kinnunen, M.-L. Riekkola, Simple coating of capillaries with anionic liposomes in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr., A* 1004 (2003) 81–90, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00570-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00570-3).
- [36] E. Ornskov, S. Ullsten, L. Söderberg, K.E. Markides, S. Folestad, Method for immobilization of liposomes in capillary electrophoresis by electrostatic interaction with derivatized agarose, *Electrophoresis* 23 (2002) 3381–3384, [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200210\)23:19<3381::AID-ELPS3381>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200210)23:19<3381::AID-ELPS3381>3.0.CO;2-4).
- [37] S.K. Wiedmer, M. Jusila, R.M.S. Hakala, K.-H. Pystynen, M.-L. Riekkola, Piperazine-based buffers for liposome coating of capillaries for electrophoresis, *Electrophoresis* 26 (2005) 1920–1927, <https://doi.org/10.1002/elps.200410277>.
- [38] Q. Yang, X.-Y. Liu, J. Miyake, H. Toyotama, Self-assembly and immobilization of liposomes in fused-silica capillary by avidin–biotin binding, *Supramol. Sci.* 5 (1998) 769–772, [https://doi.org/10.1016/S0968-5677\(98\)00122-9](https://doi.org/10.1016/S0968-5677(98)00122-9).
- [39] J.T. Hautala, M.-L. Riekkola, S.K. Wiedmer, Anionic phospholipid coatings in capillary electrochromatography, *J. Chromatogr., A* 1150 (2007) 339–347, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.025>.
- [40] J. Mei, J.-R. Xu, Y.-X. Xiao, Q.-R. Zhang, Y.-Q. Feng, Immobilized phospholipid capillary electrophoresis for study of drug–membrane interactions and prediction of drug activity, *Talanta* 75 (2008) 104–110 <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914007027333>, Accessed date: 20 November 2017.
- [41] G. Yohannes, K.-H. Pystynen, M.-L. Riekkola, S.K. Wiedmer, Stability of phospholipid vesicles studied by asymmetrical flow field-flow fractionation and capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 560 (2006) 50–56, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.042>.
- [42] M.V. Lindén, J.M. Holopainen, A. Laukkanen, M.-L. Riekkola, S.K. Wiedmer, Cholesterol-rich membrane coatings for interaction studies in capillary electrophoresis: application to red blood cell lipid extracts, *Electrophoresis* 27 (2006) 3988–3998, <https://doi.org/10.1002/elps.200600002>.
- [43] D.-L. Xian, K.-L. Huang, S.-Q. Liu, J.-Y. Xiao, Quantitative retention-activity relationship studies by liposome electrokinetic chromatography to predict skin permeability, *Chin. J. Chem.* 26 (2008) 671–676, <https://doi.org/10.1002/cjoc.200890127>.
- [44] J.T. Hautala, S.K. Wiedmer, M.-L. Riekkola, Anionic liposomes in capillary electrophoresis: effect of calcium on 1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine/phosphatidylserine-coating in silica capillaries, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1769–1776, <https://doi.org/10.1007/s00216-004-2491-7>.
- [45] Z. Leonenko, A. Garmini, D. Cramb, Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1509 (2000) 131–147, [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00288-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00288-1).
- [46] I. Reviakine, A. Brisson, formation of supported phospholipid bilayers from unilamellar vesicles investigated by atomic force microscopy, *Langmuir* 16 (2000) 1806–1815, <https://doi.org/10.1021/la9903043>.
- [47] J. Jass, T. Tjärnhage, G. Puu, From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study, *Biophys. J.* 79 (2000) 3153–3163, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76549-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76549-0).
- [48] T. Viitala, J.T. Hautala, J. Vuorinen, S.K. Wiedmer, Structure of anionic phospholipid coatings on silica by dissipative quartz crystal microbalance, *Langmuir* 23 (2007) 609–618, <https://doi.org/10.1021/la060923t>.
- [49] S.K. Poole, C.F. Poole, Quantitative structure–retention (property) relationships in micellar electrokinetic chromatography, *J. Chromatogr., A* 1182 (2008) 1–24, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.12.080>.
- [50] F. Wohnslund, B. Fallner, High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 923–930, <https://doi.org/10.1021/jm001020e>.
- [51] K. Sugano, H. Hamada, M. Machida, H. Ushio, High throughput prediction of oral absorption: improvement of the composition of the lipid solution used in Parallel artificial membrane permeation assay, *J. Biomol. Screen* 6 (2001) 189–196, <https://doi.org/10.1177/108705710100600309>.
- [52] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary, *Anal. Chem.* 57 (1985) 834–841, <https://doi.org/10.1021/ac00281a014>.
- [53] P. Crivori, G. Cruciani, P.-A. Carrupt, B. Testa, Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2204–2216, <https://doi.org/10.1021/jm990968>.
- [54] O. Tsinman, K. Tsinman, N. Sun, A. Avdeef, Physicochemical selectivity of the BBB microenvironment governing passive diffusion—matching with a porcine brain lipid extract artificial membrane permeability model, *Pharm. Res. (N. Y.)* 28 (2011) 337–363, <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0280-x>.
- [55] H. Yang, Q. Wang, W.R. Elmquist, Fluconazole distribution to the brain: a crossover study in freely-moving rats using in vivo microdialysis, *Pharm. Res. (N. Y.)* 13 (1996) 1570–1575, <https://doi.org/10.1023/A:1016048100712>.
- [56] F. Cheng, Y. Ho, L. Hung, C. Chen, T. Tsai, Determination and pharmacokinetic profile of omeprazole in rat blood, brain and bile by microdialysis and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr., A* 949 (2002) 35–42, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01225-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01225-0).
- [57] J. Mensch, A. Melis, C. Mackie, G. Verreck, M.E. Brewster, P. Augustijns, Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74 (2010) 495–502, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.01.003>.
- [58] K.M. Mahar Doan, J.E. Humphreys, L.O. Webster, S.A. Wring, L.J. Shampine, C.J. Serajit-Singh, K.K. Adkison, J.W. Polli, Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 303 (2002) 1029–1037, <https://doi.org/10.1124/jpet.102.039255>.
- [59] Y. Lin, S. Awazu, M. Hanano, H. Nogami, Pharmacokinetic aspects of elimination from plasma and distribution to brain and liver of barbiturates in rat, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 21 (1973) 2749–2756, <https://doi.org/10.1248/cpb.21.2749>.
- [60] R. Scheyer, M. Doring, J. Hochholzer, D. Spencer, J. Cramer, R. Mattson, Phenytoin concentrations in the human brain: an in vivo microdialysis study, *Epilepsy Res.* 18 (1994) 227–232, [https://doi.org/10.1016/0920-1211\(94\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0920-1211(94)90043-4).
- [61] A. Mabondzo, M. Bottlaender, A.-C. Guyot, K. Tsouini, J.R. Deverre, P.V. Balimane, Validation of in vitro cell-based human Blood–Brain barrier model using clinical positron emission tomography radioligands to predict in vivo human brain penetration, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 1805–1815, <https://doi.org/10.1021/mp1002366>.
- [62] J. Messenheimer, R.E. Ramsay, L.L. Willmore, R.F. Leroy, J. Zielinski, R. Mattson, J.M. Pellock, A.M. Valakas, G. Womble, M. Risner, Lamotrigine therapy for partial seizures: a multicenter, placebo-controlled, double-blind, cross-over trial, *Epilepsia* 35 (1994) 113–121, <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1994.tb02920.x>.
- [63] X. Liu, B.J. Smith, C. Chen, E. Callegari, S.L. Becker, X. Chen, J. Cianfagna, A.C. Doran, S.D. Doran, J.P. Gibbs, N. Hoses, J. Liu, F.R. Nelson, M.A. Szwec, J. Van Deusen, Use of a physiologically based pharmacokinetic model to study the time to reach brain equilibrium: an experimental analysis of the role of blood-brain barrier permeability, plasma protein binding, and brain tissue binding, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 313 (2005) 1254–1262, <https://doi.org/10.1124/jpet.104.079319>.
- [64] T. Tetsuya, D. Yoshiharu, K. Yuko, W.M. Pardridge, T. Akira, Determination of in vivo steady-state unbound drug concentration in the brain interstitial fluid by microdialysis, *Int. J. Pharm.* 81 (1992) 143–152, [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90006-N](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90006-N).
- [65] P. Garg, J. Verma, In silico prediction of blood brain barrier permeability: an artificial neural network model, *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2006) 289–297, <https://doi.org/10.1021/ci050303i>.
- [66] K. Rose, L.H. Hall, L.B. Kier, Modeling blood-brain barrier partitioning using the electrotopological state, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 42 (2002) 651–666, <https://doi.org/10.1021/ci010127n>.
- [67] J.A. Platts, M.H. Abraham, Y.H. Zhao, A. Hersey, L. Ijaz, D. Butina, Correlation and prediction of a large blood-brain distribution data set—an LFER study, *Eur. J. Med. Chem.* 36 (2001) 719–730, [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(01\)01269-7](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(01)01269-7).
- [68] R.C. Young, R.C. Mitchell, T.H. Brown, C.R. Gandell, R. Griffiths, M. Jones, K.K. Rana, D. Saunders, I.R. Smith, N.E. Sore, Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H2 receptor histamine antagonists, *J. Med. Chem.* 31 (1988) 656–671 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2894467>, Accessed date: 23 November 2017.
- [69] S.R. Mente, F. Lombardo, A recursive-partitioning model for blood–brain barrier permeation, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 19 (2005) 465–481, <https://doi.org/10.1007/s10822-005-9001-7>.
- [70] R.A. Hawkins, A. Mokashi, I.A. Simpson, An active transport system in the blood–brain barrier may reduce levodopa availability, *Exp. Neurol.* 195 (2005) 267–271, <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.04.008>.
- [71] R.L. O’Kane, R.A. Hawkins, Na⁺-dependent transport of large neutral amino acids occurs at the albuminal membrane of the blood–brain barrier, *Am. J. Physiol. Metab.* 285 (2003) E1167–E1173, <https://doi.org/10.1152/ajpmet.00193.2003>.
- [72] J.C. Kalvas, T.S. Maurer, G.M. Pollack, Use of plasma and brain unbound fractions to assess the extent of brain distribution of 34 drugs: comparison of unbound concentration ratios to in vivo p-glycoprotein efflux ratios, *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 660–666, <https://doi.org/10.1124/dmd.106.012294>.
- [73] J.W. Polli, T.M. Baughman, J.E. Humphreys, K.H. Jordan, A.L. Mote, J.A. Salisbury,

- T.K. Tippin, C.J. Serabjit-Singh, P-glycoprotein influences the brain concentrations of cetirizine (Zyrtec®), a second-generation non-sedating antihistamine, *J. Pharmacol. Sci.* 92 (2003) 2082–2089, <https://doi.org/10.1002/jps.10453>.
- [74] J.T. Goodwin, D.E. Clark, In silico predictions of blood-brain barrier penetration: considerations to “keep in mind”, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 315 (2005) 477–483, <https://doi.org/10.1124/jpet.104.075705>.
- [75] W.J. Jusko, M. Greth, Plasma and tissue protein binding of drugs in pharmacokinetics, *Drug Metab. Rev.* 5 (1976) 43–140, <https://doi.org/10.3109/03602537608995839>.
- [76] L. Di, E.H. Kerns (Eds.), *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2015, <https://doi.org/10.1002/9781118788523>.
- [77] R.A. Hawkins, A. Mokashi, I.A. Simpson, An active transport system in the blood-brain barrier may reduce levodopa availability, *Exp. Neurol.* 195 (2005) 267–271, <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2005.04.008>.
- [78] K. Lanevskij, P. Japertas, R. Didziapetris, A. Petruskas, Ionization-specific prediction of blood–brain permeability, *J. Pharmacol. Sci.* 98 (2009) 122–134, <https://doi.org/10.1002/JPS.21405>.
- [79] A. Tsuji, Small molecular drug transfer across the blood-brain barrier via carrier-mediated transport systems, *NeuroRx* 2 (2005) 54–62, <https://doi.org/10.1602/neuroRx.2.1.54>.
- [80] A. Durand, J.P. Thénot, G. Bianchetti, P.L. Morselli, Comparative pharmacokinetic profile of two imidazopyridine drugs: zolpidem and alpidem, *Drug Metab. Rev.* 24 (1992) 239–266, <https://doi.org/10.3109/03602539208996294>.

Publikace 4

Górecki L., Junová L., Kučera T., Hepnarová V., Prchal L., Kobllová T., Múčková L., Soukup O., Korábečný J.: Tacroximes: novel unique compounds for the recovery of organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase. *Future Medicinal Chemistry*, 11, 2019:2625-2634.

Míra zapojení autora dizertační práce:

- stanovení predikce penetrace zkoumaných látek skrz HEB MDCK metodou
- vyhodnocení dat včetně statistického zpracování

Tacroximes: novel unique compounds for the recovery of organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase

Lukas Gorecki^{1,2}, Lucie Junova^{1,2}, Tomas Kucera¹, Vendula Hepnarova^{1,2}, Lukas Prchal², Tereza Koblrova^{1,2}, Lubica Muckova^{1,2}, Ondrej Soukup^{1,2} & Jan Korabecny^{*1,2}

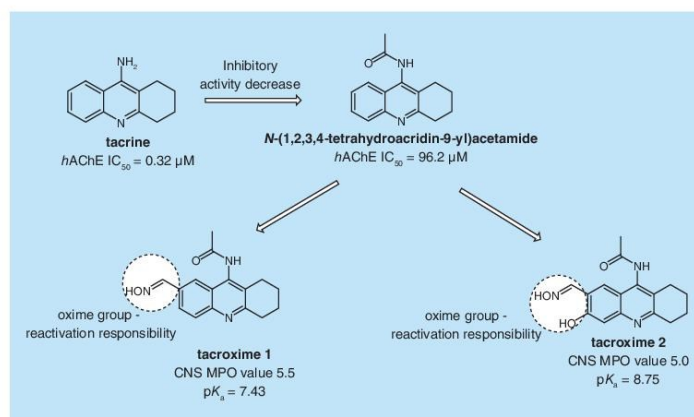
¹Department of Toxicology & Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, Hradec Kralove 500 01, Czech Republic

²Biomedical Research Centre, University Hospital Hradec Kralove, Sokolska 581, Hradec Kralove 500 05, Czech Republic

*Author for correspondence: Tel.: +420 495 833 447; jan.korabecny@fnhk.cz

Aim: Organophosphorus compounds are irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. Without immediate countermeasure, intoxication leads quickly to death. None of the clinically-used causal antidotes can ensure a good prognosis for any poisoned patient. When fallen into the wrong hands, organophosphates represent a serious threat to mankind. **Results & methodology:** Herein, we describe two novel compounds as unique merged molecules built on a tacrine scaffold against organophosphorus intoxication. These reactivators of acetylcholinesterase have balanced physicochemical properties, and should be able to cross the blood-brain barrier with a slightly lowered cytotoxicity profile compared to reference tacrine. **Conclusion:** Their efficiency compared with pralidoxime and obidoxime was proved against dichlorvos.

Graphical abstract:



First draft submitted: 25 January 2019; Accepted for publication: 12 August 2019; Published online: 26 September 2019

Keywords: acetylcholinesterase • dichlorvos • nerve agent • organophosphorus • oxime reactivator • pesticide • tacrine

Nerve agents (NAs), among the most toxic of the chemical warfare agents, have been known for over 80 years. Their deadly effect has been demonstrated several times throughout recent history [1]. A member of the organophosphorus compound (OPC) family, OP pesticides, likewise represent a serious burden for mankind [2]. Nevertheless there is

newlands
press

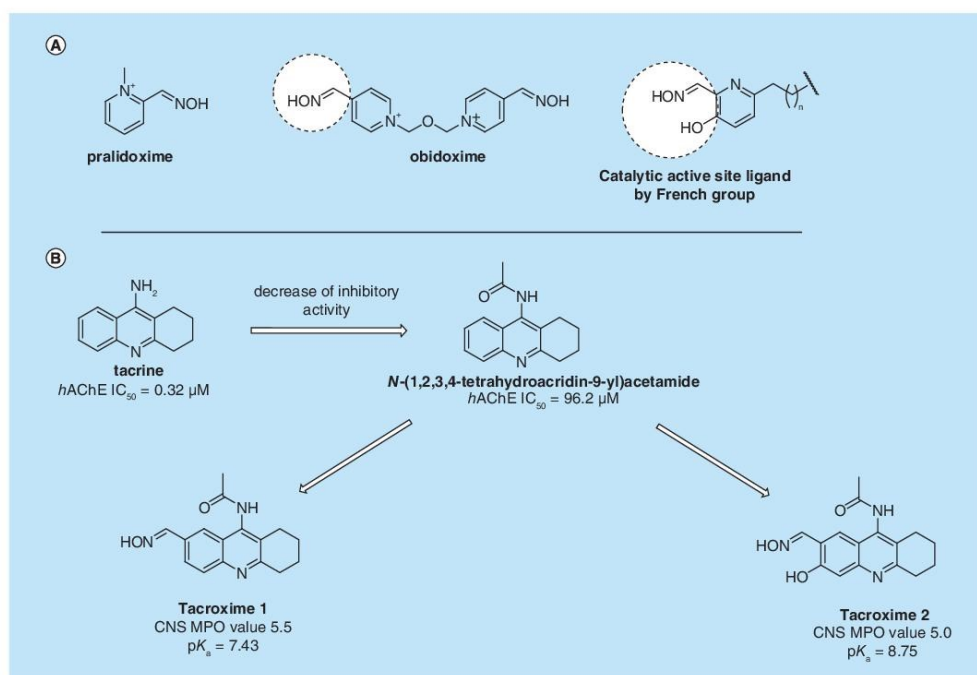


Figure 1. Design consideration for novel tacroximes 1 and 2 as acetylcholinesterase reactivators. (A) Clinically used reactivators pralidoxime and obidoxime and the catalytic anionic site ligand presented by French group [8,9]. (B) The optimization of the tacrine structure in order to decrease affinity to the native enzyme and to incorporate a reactivating moiety. CNS: Central nervous system; MPO: Multiparameter optimization desirability.

still no reliable antidote that would offer efficient medical assurance for intoxicated patients [3]. The only clinically used causal drugs are pyridinium aldioximes that act as acetylcholinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7) reactivators (Figure 1). These compounds possess significant drawbacks and their practical use might even be questionable [4,5]. Modern approaches to develop an antidote arose from the standard vision of bis-quaternary compounds and introduced novel molecules [6,7]. Even though they overcame limitations of the older molecules and exceeded their capability, other downsides were exposed that resulted in their being discarded from the clinical trial pathway [6].

In our approach, we turned our attention to tacrine, the first available therapeutic for Alzheimer's disease, which has been used as a symptomatic drug to alleviate symptoms related to this neurological condition [10]. Since tacrine is a potent AChE inhibitor, from this point of view it can be considered as an inappropriate template to be used for AChE reactivation, where lower enzyme affinity is demanded for appropriate reactivation [11]. Initially, we reduced its potency by introducing an *N*-acetyl moiety on the primary amino group (Figure 1). As expected, this modification decreased the potency of AChE inhibition by hampering protonation of the 9-amino group at $pH = 7.4$ (theoretically calculated by MarvinSketch and consequently confirmed experimentally, see Table 1).

Materials & methods

Synthesis

The column chromatography was performed using silica gel 100 at atmospheric pressure (70–230 mesh American Society for Testing and Materials [ASTM] grade, Fluka, Prague Czech Republic). Analytical thin-layer chromatography was carried out using plates coated with silica gel 60 with fluorescent indicator F254 (Merck, Prague Czech

Table 1. The inhibitory activities on human recombinant acetylcholinesterase, human plasmatic butyrylcholinesterase and cytotoxicity profile against HepG2 cells.

Compound	Inhibitory activity [†]		Cytotoxicity [‡] HepG2, IC ₅₀ ± SEM (μM)	BBB penetration estimation ^{†,‡}	
	hAChE inhibition (%/hAChE, IC ₅₀ ± SEM (μM))	hBChE inhibition (%) or hBChE, IC ₅₀ ± SEM (μM) [‡]		Papp ± SEM (× 10 ⁻⁶ cm s ⁻¹)	CNS (+/-)
Tacroxime 1	30% at 100 μM	No inhibition at 100 μM	160 ± 9.4	9.1 ± 2.5	+
Tacroxime 2	110 ± 12	No inhibition at 100 μM	340 ± 21	4.0 ± 0.7	+
Pralidoxime	220 ± 17	140 ± 12	26,000	0	-
Obidoxime	200 ± 8.0	5400 ± 550	4,300	1.0 ± 0.3	-
Tacrine	0.3 ± 0.01	0.09 ± 0.001	170 ± 3.6	25 ± 3.4	+
<i>N</i> -acetylthiocholine	96 ± 9.8	13% at 100 μM	n.t.	n.t.	n.t.
7-methoxytacrine	10 ± 1.0	18 ± 0.8	44 ± 3.4	17 ± 3.6	+

[†]IC₅₀ values were measured by modified Ellman's assay [12].
[‡]The results are expressed as the mean of at least three independent experiments;
[‡]CNS + (high BBB permeation predicted): Papp (× 10⁻⁶ cm s⁻¹) >4.0; CNS - (low BBB permeation predicted): Papp (× 10⁻⁶ cm s⁻¹) <2.0; CNS ± (BBB permeation uncertain): Papp (× 10⁻⁶ cm s⁻¹) from 4.0 to 2.0 [13].
The prediction of BBB penetration.
BBB: Blood-brain barrier; CNS: Central nervous system; Papp: Permeability coefficient value; n.t.: Not tested; SEM: Standard error of the mean.

Republic). Thin-layer chromatography plates were visualized by exposure to ultraviolet light (254 nm) or by the detection reagents phosphomolybdic acid (PMA) or *p*-anisaldehyde (PERNOD). NMR spectra were all recorded on a Varian S500 spectrometer (500 MHz for ¹H and 126 MHz for ¹³C). Chemical shifts are reported in δ p.p.m. referenced to internal standard SiMe₄ for ¹H NMR and chloroform-*d* (CHCl₃-*d*₁; 7.26 [D]; 77.16 [C] p.p.m.), CD₃OD (CH₃OH-*d*₄; 3.35, 4.78 [D], 49.3 [C] p.p.m.) or hexadeuteriodimethylsulfoxide (DMSO-*d*₆; 2.50 [D], 39.7 [C] p.p.m.). Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC and were used without additional purification. CEM Explorer SP 12 S Class was used for microwave irradiation. Human recombinant AChE (*h*AChE, EC 3.1.1.7), human recombinant BChE (*h*BChE, EC 3.1.1.8), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (Ellman's reagent, DTNB), acetylthiocholine (ATC) and butyrylthiocholine (BTC) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). The final compounds were analyzed by LC-MS consisting of UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS coupled with Q Exactive Plus orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) to obtain high resolution mass spectra. Gradient LC analysis confirmed >95% purity.

Molecular modeling

Structures of *h*AChE complexed with donepezil were downloaded from RCSB Protein Data Bank (PDB ID: 4EY7) [14]. From the receptor structure, donepezil and water molecules were removed and Ser203 was manually modified by Chimera according to the structure PDB ID: 2Y2U (*Mus musculus* AChE, nonaged enzyme, inhibited by nerve agent VX). Residue His447 was protonated and manually modified by the DockPrep function of UCSF Chimera (version 1.4) and converted to pdbqt-files by AutodockTools (v. 1.5.6) [15,16]. The complex was then minimized by 1000 steps and the receptor was minimized again by Chimera in 100 steps. Flexible residues were selected with respect to our previous knowledge gained from *h*AChE docking, using centered region around the cavity gorge [17–19]. Structures of ligands were constructed by Open Babel (v. 2.3.1), minimized by Avogadro (v. 1.1.0) and converted to pdbqt-file format by AutodockTools [20]. The docking calculations were carried out by Autodock Vina (v. 1.1.2) with an exhaustiveness of 8 [21]. Docking experiment was reproduced 20-times and the best hit was selected for manual inspection. PyMOL software was used to render three-dimensional poses (PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC, Mannheim, Germany). 2D diagrams were made by Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v 17.2.0.16349, San Diego: Dassault Systèmes, 2016 (CA, USA).

Reactivation assay

The reactivation potency of the standard and tacroximes was evaluated on human recombinant AChE and human plasma BChE. The enzyme was inhibited by a solution of the appropriate cholinesterase inhibitor – tabun, sarin, paraoxon, dichlorvos or VX – in propan-2-ol at a concentration of 10⁻⁵ M for 60 min. Excess inhibitor was subsequently removed using an octadecylsilane-bonded silica gel SPE cartridge. Inhibited enzyme was incubated

for 10 min with a solution of reactivator at concentrations 10^{-4} and 10^{-5} M at 37°C . The reaction was started by addition of the substrate acetylthiocholine/butrylthiocholine (ATC/BTC). The activity of AChE/BChE was then measured spectrophotometrically at 412 nm by the modified method according to Ellman. Each concentration of reactivator was assayed in triplicate. The obtained data were used to compute reactivation potency (R ; Equation 1). Results were corrected for oximolysis and inhibition of AChE/BChE by reactivator.

$$R = \left(1 - \frac{\Delta A_0 - \Delta A_r}{\Delta A_0 - \Delta A_i} \right) \times 100 \quad [\%] \quad (\text{Eq. 1})$$

ΔA_0 – change in absorbance caused by intact cholinesterases (phosphate buffer instead of AChE/BChE inhibitor), ΔA_i – change in absorbance provided by AChE/BChE exposed to inhibitors and ΔA_r – change in absorbance caused by AChE/BChE incubated with the solution of reactivator.

Inhibition assay

The AChE/BChE inhibitory potency was tested according to protocol of Ellman. Obtained data are shown as IC_{50} values [12]. *b*BChE and *h*AChE enzymes were prepared at the Department of Toxicology and Military Pharmacy (Faculty of Military Health Sciences, Hradec Kralove, Czech Republic). Phosphate buffer (PB, pH 7.4), (Ellman's reagent, DTNB) and BTC, were purchased from Sigma-Aldrich, Prague, Czech Republic. Polystyrene Nunc 96-well microplates with flat-bottom shape (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) were utilized for measuring purposes.

About 0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer (pH 7.4) was used for all the assays. Enzyme solutions were prepared at 2.0 units/mL in 2 mL aliquots. The assay medium (100 μL) was assembled with 20 μL of 0.01 M DTNB, 40 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), 10 μL of the enzyme and 20 μL of 0.01 M substrate (ATC iodide solution).

Inhibitor solutions in concentration range 10^{-3} – 10^{-9} M were prepared and IC_{50} were calculated. Tested compounds were pre-incubated for 5 min followed by immediate addition of the substrate (20 μL). The activity was determined by measuring the increase in absorbance at 412 nm for AChE/BChE at 37°C at 2 min intervals using a Multimode microplate reader Synergy 2 (VT, USA). Each concentration was assessed in triplicate. Statistical data evaluation was done using software GraphPad Prism 5 (CA, USA).

MDCK assay

The MDCK assay evaluates the ability of compounds to diffuse from the donor compartment through the MDCK's cell membrane into the acceptor compartment. The MDCK cells were seeded on polycarbonate membrane (area 1.12 cm^2) with 3 μm pores of the 12-well plates with 12-mm inserts. The tested compounds were dissolved in DMSO and then diluted with OptiMEM to reach final concentrations (in range 100 μM); the concentration of DMSO did not exceed 0.5 % (V/V). About 750 μL of the donor solution was added to the donor compartment (insert) and the same volume of OptiMEM was added into the acceptor. The concentration of the drug in both compartments was measured in triplicate by UV-VIS spectrophotometry, HPLC-UV or HPLC-MS after 1, 3 and 5 h of incubation. The apparent permeability coefficient (P_{app}) was calculated from the concentration ratio. The tightness of the MDCK monolayer is assessed by permeability of fluorescein isothiocyanate in 0.4 mg/mL (Equation 2) [13].

$$P_{app} = (dc/dt) \times V_r (A \times C_0) \quad (\text{Eq. 2})$$

A: area of the well/cell monolayered
 dt: amount in the receiver compartment in given time
 V_r : volume of the receiver compartment
 C_0 : the initial concentration of tested compounds

Colorimetric cell viability assay (MTT)

The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, MO, USA) reduction assay was used for cytotoxicity measurement of the compounds according to Mosmann *et al.* [22]. MTT is a water-soluble tetrazolium salt which is converted to insoluble purple formazan by succinate dehydrogenase in the mitochondria of viable cells [22,23]. Viability of cells was detected after 24-h incubation with the tested compounds. HepG2 cells were seeded into 96-well plates at 100 μL volume with density of 15×10^3 per well. The cells were

allowed to attach overnight before the treatment. Tested compounds (solution in DMSO, Sigma-Aldrich) were further diluted in Dulbecco's Modified Eagle Medium and added to the cells in the 96-well culture plates. The final concentration of DMSO was less than 0.25% per well.

After 24-h of incubation, the medium containing the serially diluted compounds was removed from each well and replaced by 100 μ L of fresh medium containing MTT (0.5 mg/ml). The plates were subsequently incubated at 37°C in a CO₂ incubator for 45 min. The medium containing MTT was then removed and the formazan dissolved in 100 μ L of DMSO. The optical density of each well was measured using Synergy 2 MultiMode Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., VT, USA) at 570 nm. The cell viability was determined as the percentage of untreated control. Each experiment was carried out in triplicate and repeated independently four-times [24].

The IC₅₀ values were calculated using four parametric nonlinear regressions by statistic software GraphPad Prism (version 5.04, GraphPad Software Inc., CA, USA) from the logarithmic dose–response curve. The IC₅₀ values were expressed as a mean \pm standard error of the mean.

Results & discussion

All the clinically used reactivators bear an aldoxime (hydroxyiminomethyl) moiety responsible for the reactivation process. All efforts made to find another nucleophilic group have been more or less fruitless [6]. With this in mind, we amalgamated an aldoxime group into the structure of *N*-(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)acetamide (*N*-acetyl tacrine; Figure 1). As a result, we envisaged two small molecules, namely tacroxime 1 and tacroxime 2. We presumed that these might have preserved AChE affinity based on the tricyclic core with low-to-moderate activity toward the native enzyme, together with reactivation ability and balanced physicochemical properties. Indeed, we predicted that both tacroxime 1 as well as tacroxime 2 might be centrally active based on the CNS MPO (multiparameter optimization) calculations indicating scores of 5.5 and 5.0, respectively. These values are above the limit for centrally active drugs [25]. This feature can also help to overcome the well-pronounced issue of low blood–brain barrier (BBB) permeability reported for all the pyridinium aldoximes [26]. The difference between tacroxime 1 and tacroxime 2 is in the presence of a hydroxyl group in the position 6 of the tacrine skeleton in the latter. Indeed, this structural feature mimics the previously reported 3-hydroxypyridin-2-aldoxime reactivators developed by group from the University of Rouen [8,9]. It has been also hypothesized that the 3-hydroxypyridin-2-aldoxime moiety might prevent the recapture phenomenon in terms of re-alkylation of the phosphoxime moiety by formation of a cyclic adduct isoxazolo[4,5-*b*]pyridine [27,28]. The crucial aspect in the development of oxime reactivators is also their capability to form active oximate anion under physiological conditions, as indicated by the dissociation constant (pK_a). Accordingly, the optimal range of pK_a value for the oxime has been disclosed to lie between 7.0 and 8.35, where at least 10 % of oxime is in the dissociated state [29]. Tacroxime 1 has a predicted ideal value of 7.43, while tacroxime 2 has a slightly increased pK_a of 8.75 (calculated by MarvinSketch).

As preliminary data, we applied molecular modeling technique for nonaged tabun-, paraoxon-, VX- and sarin-inhibited AChE complexes. Herein, we selected to display and pinpoint the potential ability of tacroxime 2 to recover the activity of AChE after VX inhibition (Figure 2). The putative binding mode placed tacroxime 2 into the bottom of 20 Å deep AChE cavity. The 1,2,3,4-tetrahydroacridine core revealed favorable lodging, being π – π stacked against Tyr337 (3.7 Å) and Phe338 (3.8 Å) in parallel and T-shaped modes, respectively. Additionally, some other hydrophobic interactions between tacroxime 2 and Trp86, Asp74 and Tyr124 were observed. Two crucial aspects predicted the reactivation potency: the hydrogen bond between the hydroxyl group of tacroxime 2 and amino group of Glu202 (2.4 Å); and more importantly, the harboring of active oximate to the vicinity of the phosphorus atom of VX agent. Encouraged by the obtained results, we then proceeded to the chemistry part.

The synthesis of the reactivator tacroxime 1 apparently resembles the well-described preparation of 7-methoxytacrine, a tacrine derivative with reduced side effects [30]. Thus, benzocaine was used instead of 4-methoxyaniline and the synthetic route was analogous up to intermediate 5. Acetylation of 5 with acetic anhydride afforded 6. The final two steps of the procedure included initial reduction of the methyl ester to aldehyde, followed by reaction with hydroxylamine to yield tacroxime 1 (Figure 3A). The preparation of tacroxime 2 required a different approach. The key intermediate 7 for its synthesis was obtained as has already been described in the literature [31]. The intermediate 8 was synthesized under optimized conditions using microwave irradiation. The last three steps were identical to those for tacroxime 1 (Figure 3B). For detailed chemical analysis of intermediates and final compounds, readers are kindly referred to Supplementary data.

The inhibitory activities of the compounds were measured on hAChE and hBChE using a slightly modified method of Ellman [12,32]. The results were compared with reactivator standards as well as with tacrine,

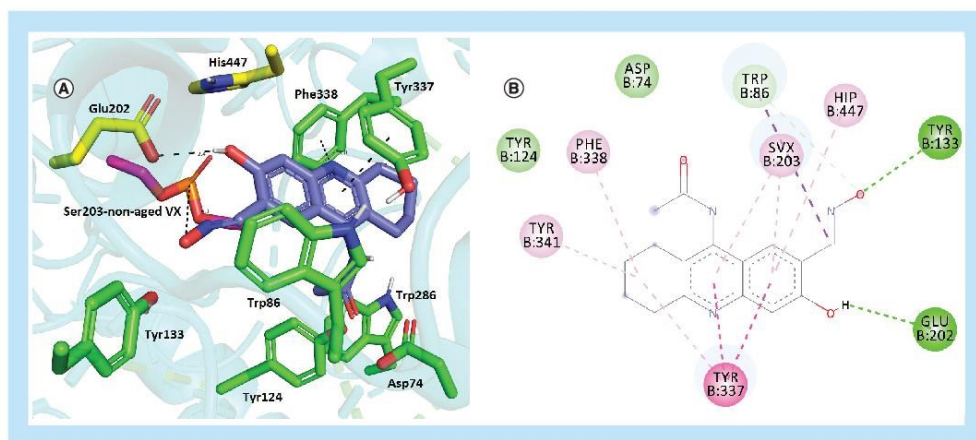


Figure 2. Top-scored docking poses of compounds tacroxime 2 in nonaged VX-inhibited-acetylcholinesterase active site (Protein Data Bank ID: 2Y2U translated to 4EY7). Close-up is presented as three-dimensional (A) and two-dimensional (B) diagrams, respectively. Generally, for A – tacroxime 2 is shown in dark blue carbon sticks, important amino acid residues in green, catalytic triad residues in yellow and VX agent in purple. Dashed lines in all figure parts represent crucial intermolecular interactions of different origin (hydrogen bonds, π - π / π -cation stacking, van der Waal interactions and other hydrophobic forces). (A) Created with The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC. (B) Rendered with Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v 17.2.0.16349, San Diego: Dassault Systèmes, 2016.

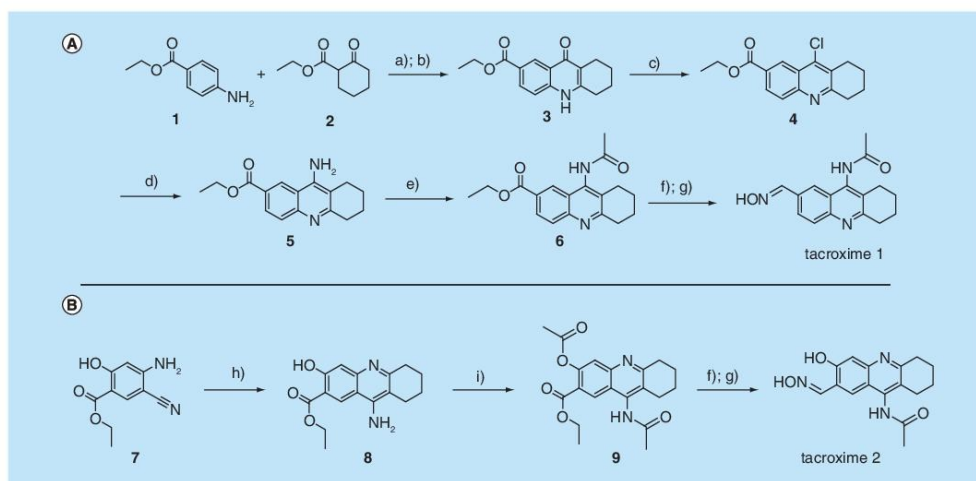


Figure 3. Synthesis procedure for tacroximes 1 and 2. (A) Preparation of tacroxime 1 from commercially available starting materials 1 and 2. (B) Preparation of tacroxime 2 from 7. Reagents and conditions: toluene, Dean-Stark trap, 150° C; diphenylether, Dean-Stark trap, 230° C; POCl_3 (10.0 eq.), 140° C; NH_3 (g), phenol, 180° C; Ac_2O (1.2 eq), pyridine, 150° C; DIBAL-H 1 M in DCM (4.0 eq.), DCM, -80° C; NH_2OH , EtOH, RT; ZnCl_2 (2.0 eq), cyclohexanone, MW irradiation (dynamic method, 150 W, 300 PSI), 150° C; i) Ac_2O (2.5 eq.), pyridine, 150° C.

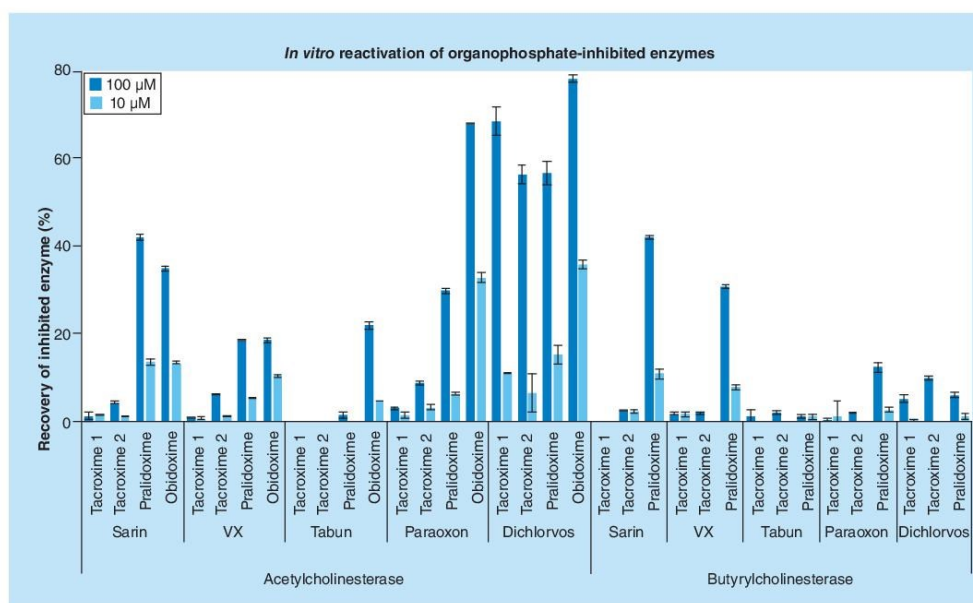


Figure 4. The reactivating potency of tacroximes with standard pralidoxime and obidoxime against organophosphate-inhibited human recombinant acetylcholinesterase and human plasmatic butyrylcholinesterase.

7-methoxytacrine and *N*-acetyltacrine (Table 1). As expected, the novel compounds tacroxime 1 and tacroxime 2 exhibited only poor-to-moderate inhibition potency toward cholinesterases. Such activity was similar to or even lower than that of standard reactivators and other tacrine derivatives that served as templates. Hepatotoxicity is one of the most pronounced side effects associated with tacrine [33]. Accordingly, we addressed this point by evaluating cytotoxicity against a human liver cancer cell line (HepG2). Based on the results, we can suggest that the toxicity of the novel leads was the same as or even lower than of tacrine. Note that the results have to be assessed with caution, since tacrine exerts its hepatotoxicity *in vivo* after biotransformation processes [34]. Pralidoxime and obidoxime displayed a less toxic profile against this cell line by one order of magnitude. The CNS availability assay predicted by MDCK cell lines allowed us to estimate that novel compounds might permeate through the BBB, which goes hand-in-hand with CNS MPO predictions. In contrast, and under same conditions, pralidoxime and obidoxime were not effective.

Next, we inspected the reactivation potency of the tacroximes for NA- and pesticide-inhibited *h*AChE and *h*BChE. The reactivating efficacy was compared with that of the clinically approved pralidoxime and obidoxime (Figure 4). Although tacroximes achieved only low capability to reactive NA-inhibited cholinesterases compared with pralidoxime, their ability to restore enzyme activity after dichlorvos inhibition was significant. Their reactivating potential was comparable with that for obidoxime at 100 μM concentration. Note that obidoxime is considered to be the best reactivator available against pesticide poisoning [35].

The relatively poor reactivation ability of tacroximes to various OPC is probably caused by their bulkiness. Notwithstanding preliminary molecular modeling simulations showing favorable orientation inside the cavity gorge, this is not corroborated by the *in vitro* data. The constricted and narrow mid-gorge region might represent a major obstacle for tacroximes to approach the site of reactivation, namely the Ser residue, in the catalytic anionic site [36]. The difference in the reactivation of dichlorvos-inhibited AChE might be explained by the overall complex topology. In that case, the residue attached to the phosphorous atom is a methoxy group, which is undoubtedly less

bulky than other OPC appendages. Accordingly, the reactivators possess more space to better fit into the CAS and easily attack the phosphorous atom. Despite the use of dichlorvos for pest control having been already abandoned in Europe and USA, in some countries it might still be in practice [37].

Conclusion

In conclusion, tacroximes are unique merged compounds based on a tacrine template possessing reactivating ability. Their design was rationally supported by molecular modeling studies and CNS MPO calculations. The latter allowed us to hypothesize that tacroximes might be centrally active. Indeed, this characteristic was further confirmed by the assay using MDCK cell monolayer. In general, tacroximes achieved significant efficacy toward dichlorvos-inhibited AChE, comparable with standards such as pralidoxime or obidoxime. We believe that tacroximes might open new avenue in transforming well-established cholinesterase binders into reactivators by simply introducing reactivating moieties (e.g., oxime functionality) into specifically defined region of the molecule capable to contact phosphorous atom of OPC. Based on the results obtained herein and given the limitation of pyridinium-charged reactivators, this might also be the case of tacroximes. Oxime reactivators able to revert pesticide intoxication induced by dichlorvos agent and presumably targeting CNS area in much better way than pyridinium oximes has to be pursued. They may also impose protection against OP-induced delayed neuropathy caused by dichlorvos or other pesticides [38]. Moreover, another aspect that has to be raised is the potential of tacroximes to protect AChE/BChE from OP-poisoning, serving as prophylactic agents [39] just as 7-methoxytacrine and related derivatives have been shown to be [40]. Tacroxime represents an interesting starting point to spur the development of novel, centrally active reactivators/or prophylactic agents with the potential to become interesting drug candidates for *in vivo* studies.

Future perspective

NAs are the most easily accessible weapons of mass destruction, thus representing a potential tool to be misused by terrorists or in armed conflicts. Since 1969, when HI-6 was introduced, none of the thousands of novel compounds has reached practice. Hundreds of novel bis-quaternary compounds failed to surpass clinically used standards. Hundreds of novel mono-quaternary molecules failed to improve on the physicochemical properties while maintaining the efficiency of the bis-quaternary reactivators. Neither do any of the hundreds of bulky uncharged molecules deliver any promise as lead candidates. The closest to that goal is the small uncharged molecule RS194B that seems to have found favor at US FDA [41,42]. We believe that small uncharged compounds are the most promising candidates. They possess balanced physicochemical properties, are able to cross BBB, and maintain or even surpass the potency of clinically used bis-pyridiniums. Herein, we followed this strategy and designed a novel class of compounds, namely tacroximes that might become good starting point in forming new protective agents against NA.

Summary points

- A new perspective on development of acetylcholinesterase reactivators was introduced.
- Two unique merged compounds of tacrine with an oxime functional group were developed.
- We provide basic *in vitro* characteristic of novel compounds.
- Molecular docking simulation was performed to investigate potential enzyme interactions.
- Significant reactivation potency against dichlorvos-inhibited acetylcholinesterase was detected.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.future-science/doi/suppl/10.4155/fmc-2019-0027

Acknowledgments

Computational resources were provided by the CESNET LM2015042 and the CERIT Scientific Cloud LM2015085, provided under the programme 'Projects of Large Research, Development, and Innovations Infrastructures'. The authors are grateful to I McColl for assistance with the manuscript.

Financial & competing interests disclosure

The work was supported by the grant of the by Ministry of Health of the Czech Republic, grant number 17-32801A, by the Faculty of Military Health Sciences (Long-term development plan and student project SV/FVZ201601), and by MH CZ - DRO (University Hospital Hradec Kralove, no. 00179906). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

Papers of special note have been highlighted as: ● of interest; ●● of considerable interest

1. Worek F, Wille T, Koller M, Thiermann H. Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Arch. Toxicol.* 90(9), 2131–2145 (2016).
- Excellent article describing current threats regarding misuse of nerve agents.
2. Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Arch. Toxicol.* 91(2), 549–599 (2017).
3. Jokanović M. Structure–activity relationship and efficacy of pyridinium oximes in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds: a review of recent data. *Curr. Top. Med. Chem.* 12(16), 1775–1789 (2012).
4. Bajgar J, Fusek J, Kuca K, Bartosova L, Jun D. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini Rev. Med. Chem.* 7(5), 461–466 (2007).
5. Jokanović M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicol. Lett.* 190(2), 107–115 (2009).
6. Gorecki L, Korabecny J, Musilek K *et al.* SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorous nerve agents and pesticides. *Arch. Toxicol.* 90(12), 2831–2859 (2016).
- Describing SAR for the development of novel cholinesterase reactivators.
7. Gorecki L, Korabecny J, Musilek K *et al.* Progress in acetylcholinesterase reactivators and in the treatment of organophosphorus intoxication: a patent review (2006–2016). *Expert Opin. Ther. Pat.* 27(9), 1–15 (2017).
- Describing current trends in the discovery of countermeasure against nerve agents.
8. Saint-André G, Kliachyna M, Kodepelly S *et al.* Design, synthesis and evaluation of new α -nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase. *Tetrahedron* 67(34), 6352–6361 (2011).
9. Mercey G, Verdelet T, Saint-André G *et al.* First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 47(18), 5295–5297 (2011).
- Pioneering study reporting the first uncharged acetylcholinesterase (AChE) reactivator.
10. Giacobini E. Invited review: cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications. *Neurochem. Int.* 32(5–6), 413–419 (1998).
11. Petroianu GA, Lorke DE. Pyridinium oxime reactivators of cholinesterase inhibited by diisopropyl-fluorophosphate (DFP): predictive value of *in-vitro* testing for *in-vivo* efficacy. *Mini Rev. Med. Chem.* 8(13), 1328–1342 (2008).
12. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95 (1961).
13. Di L, Kerns EH, Bezar IF, Petusky SL, Huang Y. Comparison of blood-brain barrier permeability assays: *in situ* brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *J. Pharm. Sci.* 98(6), 1980–1991 (2009).
14. Cheung J, Rudolph MJ, Burshteyn F *et al.* Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J. Med. Chem.* 55(22), 10282–10286 (2012).
15. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC *et al.* UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25(13), 1605–1612 (2004).
16. Morris GM, Huey R, Lindstrom W *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 30(16), 2785–2791 (2009).
17. Panek D, Więckowska A, Wichur T *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new phthalimide and saccharin derivatives with alicyclic amines targeting cholinesterases, beta-secretase and amyloid beta aggregation. *Eur. J. Med. Chem.* 125, 676–695 (2017).
18. Lemes LFN, de Andrade Ramos G, de Oliveira AS *et al.* Cardanol-derived AChE inhibitors: towards the development of dual binding derivatives for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* 108, 687–700 (2016).
19. Dolezal R, Korabecny J, Malinak D, Honegr J, Musilek K, Kuca K. Ligand-based 3D QSAR analysis of reactivation potency of mono- and bis-pyridinium aldoximes toward VX-inhibited rat acetylcholinesterase. *J. Mol. Graph. Model.* 56, 113–129 (2015).

20. O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: an open chemical toolbox. *J. Cheminform.* 3, 33 (2011).
21. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31(2), 455–461 (2010).
22. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65(1–2), 55–63 (1983).
23. Riss TL, Moravec RA, Niles AL et al. Cell viability assays. In: *Assay Guidance Manual*. Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H et al. (Eds). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, MD, USA (2004).
24. Muckova L, Pejchal J, Jost P, Vanova N, Herman D, Jun D. Cytotoxicity of acetylcholinesterase reactivators evaluated *in vitro* and its relation to their structure. *Drug Chem. Toxicol.* 42(3), 252–256 (2018).
25. Wager TT, Hou X, Verhoest PR, Villalobos A. Moving beyond rules: the development of a central nervous system multiparameter optimization (CNS MPO) approach to enable alignment of druglike properties. *ACS Chem. Neurosci.* 1(6), 435–449 (2010).
26. Soukup O, Korabecny J, Malinak D et al. *In vitro* and *in silico* evaluation of non-quaternary reactivators of AChE as antidotes of organophosphorus poisoning – a new hope or a blind alley? *Med. Chem.* 14(3), 281–292 (2018).
- **Provides insight into efficiency of dually binding AChE reactivators.**
27. Louise-Lerliche L, Paunescu E, Saint-André G et al. A HTS assay for the detection of organophosphorus nerve agent scavengers. *Chem. Weib. Bergstr. Ger.* 16(11), 3510–3523 (2010).
28. Dale TJ, Rebek J. Hydroxy oximes as organophosphorus nerve agent sensors. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48(42), 7850–7852 (2009).
29. Musil K, Florianova V, Bucek P, Dohnal V, Kuca K, Musilek K. Development and validation of a FIA/UV-vis method for pKa determination of oxime based acetylcholinesterase reactivators. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 117, 240–246 (2016).
30. Soukup O, Jun D, Zdarova-Karasova J et al. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Curr. Alzheimer Res.* 10(8), 893–906 (2013).
31. Kivrakidou O, Bräse S, Hülshorst F, Griebenow N. Solid-phase synthesis of 5-biphenyl-2-yl-1H-tetrazoles. *Org. Lett.* 6(7), 1143–1146 (2004).
32. Pohanka M, Karasova JZ, Kuca K et al. Colorimetric dipstick for assay of organophosphate pesticides and nerve agents represented by paraoxon, sarin and VX. *Talanta* 81(1–2), 621–624 (2010).
33. Blackard WG, Sood GK, Crowe DR, Fallon MB. Tacrine. A cause of fatal hepatotoxicity? *J. Clin. Gastroenterol.* 26(1), 57–59 (1998).
34. Patocka J, Jun D, Kuca K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease. *Curr. Drug Metab.* 9(4), 332–335 (2008).
35. Worek F, Eyer P, Aurbek N, Szinicz L, Thiermann H. Recent advances in evaluation of oxime efficacy in nerve agent poisoning by *in vitro* analysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 219(2–3), 226–234 (2007).
36. Dvir H, Silman I, Harel M, Rosenberry TL, Sussman JL. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* 187(1–3), 10–22 (2010).
37. Barrett K, Jaward FM. A review of endosulfan, dichlorvos, diazinon, and diuron–pesticides used in Jamaica. *Int. J. Environ. Health Res.* 22(6), 481–499 (2012).
38. Emerick GL, DeOliveira GH, dos Santos AC, Ehrlich M. Mechanisms for consideration for intervention in the development of organophosphorus-induced delayed neuropathy. *Chem. Biol. Interact.* 199(3), 177–184 (2012).
39. Bajgar J, Fusek J, Kassa J, Kuca K, Jun D. Chemical aspects of pharmacological prophylaxis against nerve agent poisoning. *Curr. Med. Chem.* 16(23), 2977–2986 (2009).
40. Nepovimova E, Korabecny J, Dolezal R et al. A 7-methoxytacrine-4-pyridinealdoxime hybrid as a novel prophylactic agent with reactivation properties in organophosphate intoxication. *Toxicol. Res.* 5(4), 1012–1016 (2016).
41. Rosenberg YJ, Mao L, Jiang X et al. Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reverses early and advanced symptoms in macaques exposed to sarin vapor. *Chem. Biol. Interact.* 274, 50–57 (2017).
- **Detailed *in vivo* assessment of one of the most potent AChE reactivator.**
42. Rosenberg YJ, Wang J, Ooms T et al. Post-exposure treatment with the oxime RS194B rapidly reactivates and reverses advanced symptoms of lethal inhaled paraoxon in macaques. *Toxicol. Lett.* 293, 229–234 (2018).
- **Detailed *in vivo* assessment of one of the most potent AChE reactivator.**

Publikace 5

Soukup O., Korábečný J., Maliňák D., Nepovimová E., Pham N., Musílek K., Hrabínová M., Hepnarová V., Doležal R., Pávek P., Jošt P., Koblíková T., Janočková J., Górecki L., Psoška M., Nguyen TD., Box K., Outhwaite B., Čečková M., Šorf A., Jun D., Kuča K.: In vitro and in silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning – a New Hope or a Blind Alley? *Medicinal Chemistry*, 14, 2018:281-292.

Míra zapojení autora dizertační práce:

- stanovení predikce penetrace zkoumaných látek skrz HEB PAMPA a MDCK metodou
- vyhodnocení dat včetně statistického zpracování



RESEARCH ARTICLE

In vitro and *in silico* Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning - a New Hope or a Blind Alley?



Ondrej Soukup^{1,2}, Jan Korabecny^{1,2}, David Malinak², Eugenie Nepovimova^{1,2}, Ngoc L. Pham¹, Kamil Musilek^{1,2,3}, Martina Hrabinoval¹, Vendula Hepnarova¹, Rafael Dolezal², Petr Pavek⁴, Petr Jost¹, Tereza Koblrova^{1,2}, Jana Jankockova², Lukas Gorecki^{1,2}, Miroslav Psocka², Thuy D. Nguyen^{1,2}, Karl Box⁵, Breeze Outhwaite⁵, Martina Ceckova⁴, Ales Sorf⁴, Daniel Jun^{1,*} and Kamil Kuca^{2,*}

¹Department of Toxicology and Military Pharmacy, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic; ²Biomedical Research Centre, University Hospital, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic; ³Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Hradec Kralove, Hradec Kralove, Czech Republic; ⁴Department of Pharmacology and Toxicology Pharmaceutical Faculty, Charles University, Heyrovského 1203, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic; ⁵Sirius Analytical Ltd, Forest Row, East Sussex, United Kingdom

Abstract: Background: In the last decade, the concept of uncharged reactivators potentially able to penetrate the CNS has been introduced as an alternative to the classic charged oxime reactivators. However, this concept brings with it several associated drawbacks such as higher lipophilicity, difficulty in administration, lower affinity to cholinesterases, and higher toxicity risk.

Objective: In this study, we compare data obtained for a set of five classic charged reactivators and a set of three recently published uncharged oximes supplemented by two novel ones.

Methods: This time, we used only *in silico* prediction and *in vitro* approaches.

Results: Our data showed that tested uncharged oximes have low affinity for cholinesterases, do not possess high reactivation potency, and certainly represent a greater toxicity risk due to higher lipophilicity. We assume that balanced physicochemical properties will be required for the successful treatment of OP poisoning. Nevertheless, the compound meeting such criteria and pinpointed *in silico* (K1280) failed in this particular case.

Conclusion: From the presented data, it seems that the concept of uncharged reactivators will have to be modified, at least to improve the bioavailability and to satisfy requirements for *in vivo* administration.

ARTICLE HISTORY

Received: November 26, 2017
Revised: January 10, 2018
Accepted: January 11, 2018

DOI:
10.2174/1573406414666180112105657

Keywords: Anxiety, acetylcholinesterase, organophosphate, oxime reactivators, quaternary oximes, non-quaternary oximes, neurotransmission.

1. INTRODUCTION

Organophosphorus nerve agents (NAs: G-agents – tabun, sarin, soman, cyclosarin, V-agents – VX, Russian VX) and pesticides (e.g. chlorpyrifos, methamidophos, malathion) are highly toxic compounds that represent a permanent threat to the population in both armed conflicts and in civilian society (e.g. Gulf War, Tokyo subway attack, Syria in 2013 and 2017, assassination of Kim Jong-nam). Their mechanism of

action involves irreversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE, E.C. 3.1.1.7) which under physiological conditions cleaves acetylcholine (ACh) and ensures neurotransmission [1]. Acute toxicity leads to the accumulation of ACh at neuronal synapses and the neuromuscular junction, and manifests as two types of symptoms: muscarinic (e.g. salivation, blurred vision, sweating, bradycardia, hypotension, GIT hypermotility) and nicotinic (e.g. muscle weakness, fasciculation and paralysis). The lipophilic nature of organophosphates allows direct blood-brain barrier (BBB) penetration and leads to poorly-controlled central symptoms (e.g. anxiety, confusion, ataxia, seizures). Untreated organophosphate (OP) poisoning inhibits the respiratory center and together

*Address correspondence to this author at the Biomedical Research Centre, University Hospital, Sokolska 581, 500 05 Hradec Kralove, Czech Republic; Tel: +420-603-289-166; E-mail: kamil.kuca@fnhk.cz

with bronchoconstriction and muscle paralysis leads to death by suffocation [2].

Acute intoxication with OP agents can be managed *via* a general strategy consisting of administration of a parasympatholytic agent (*e.g.* atropine), oxime reactivator or anti-convulsant drug (*e.g.* diazepam) [3]. Besides the generally accepted fact that there is no universal reactivator [4], the main drawback of atropine administration is the protection of only the muscarinic receptors, despite the fact that *in vitro* inhibition of nicotinic receptors has been also reported by some authors [5]. Another disadvantage of atropine is its limited availability in the brain. Unfortunately, oxime reactivators also show very limited bioavailability in the brain. Even though pralidoxime has been reported to be available in the brain by approximately 10% [6], such availability seems to be overestimated, especially in the case of bispyridinium oximes [7]. During recent decades, many oxime reactivators (mostly based on the pyridinium scaffold) have been synthesized and evaluated for their reactivation potency against different types of OP inhibitors (for review see [8]). Unfortunately, low CNS availability and limited versatility usually persist. The high end of the pursuit for the optimal quaternary reactivator can be represented by oxime-hydroxamate hybrids capable of AChE reactivation and OP agent degradation at the same time, leading to high protective ratios against soman, sarin, cyclosarin and VX poisoning [9]. However, even in this study data on the CNS availability and efficacy against tabun are missing.

In the last decade, the concept of uncharged reactivators able to penetrate the CNS has been introduced in order to protect the brain (for review see [10]). However, this concept also brings some practical drawbacks which are associated with the change in molecular properties. Specifically, higher lipophilicity leads to low solubility, lower reactivation ability, higher promiscuity of the compounds, off-targeting and increased toxicity, which may be even more pronounced in the central compartment [11].

The concept of non-quaternary reactivators was originally proposed by Mercey *et al.* linking a phenyltetrahydroisoquinoline building block, ensuring an anchor to the peripheral anionic site (PAS) of AChE, to a hydroxylated pyridinealdoxime as the reactivation-ensuring moiety [12]. Ongoing studies have shown good to excellent *in vitro* reactivation potency against tabun and VX-inhibited AChE [13]. However, after selected candidates had been used in the mouse model, the "gold standard" reactivator asoxime (HI-6) showed much higher efficacy [14]. When linked to an imidazolium aldoxime, phenyltetrahydroisoquinoline derivatives were also reported to have good reactivation potency *in vitro* compared to asoxime, obidoxime, trimedoxime and methoxime [15]. Unfortunately, there are no *in vivo* data which would confirm the druggability and effectiveness of such compounds. Further, non-quaternary ketoximes based on benzhydryl-piperidine were synthesized and evaluated *in vitro* against sarin-, VX- and tabun-inhibited AChE, and showed higher efficacy than 4-PAM but lower than asoxime [16]. A non-quaternary series of imidazolium aldoximes further extended by an azepane analog (lead compound RS194B) were reported as promising AChE reactivators [17]. Unfortunately, the low toxicity and good CNS avail-

ability of those compounds *in vivo* are somewhat knocked down by low efficacy against tabun-inhibited AChE, and by the fact that high efficacy against VX-, sarin- and cyclosarin-inhibited AChE *in vitro* is only comparable to that of 2-PAM. The same can be postulated about the amidine-oxime series, showing low acute toxicity and *in vivo* protection, but only superior to MINA and not even to 2-PAM [18]. Other standard reactivators such as asoxime or obidoxime were not tested in these studies. Altogether, although non-quaternary oximes undoubtedly represent an innovative group of compounds, their potential clinical benefit has never been truly validated. The question whether non-quaternary oximes surpass quaternary ones cannot be easily answered as there is no thorough comparison of both families. The above-mentioned studies often correlate the findings to less effective standards (2-PAM, MINA), use only surrogates of nerve agents, or omit some of the nerve agent representatives.

The aim of this study is to compare *in vitro* data of both groups in order to estimate the benefits of non-quaternary oximes over the classic charged reactivators (asoxime, obidoxime, trimedoxime, methoxime and pralidoxime). Summarized here are full sets of data describing physicochemical parameters, reactivation efficacy against sarin, tabun and paraoxon, affinity to native cholinesterases, and *in silico* prediction of toxicity, cytotoxicity and estimation of blood-brain barrier penetration. We have chosen already-published representatives of uncharged AChE reactivators, optimized their synthetic procedures and further extended the group by two novel prospective non-quaternary oximes (Fig. 1).

2. MATERIALS AND METHODS

For the whole material and methods part see Supplementary Information.

3. DESIGN, OPTIMIZATION AND SYNTHESIS OF UNCHARGED REACTIVATORS

In this work, we have envisaged and carried out the synthesis of three known non-quaternary reactivators, namely 6-(5-(3,4-dihydro-1*H*-pyrido[3,4-*b*]indol-2(9*H*)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde oxime (K1279) (**17**), 6-(5-(6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde oxime (K1278) (**18**), and 2-(hydroxyimino)-*N*-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)ethanamide (K1280) (**24**) [12, 13c, 17a], and also applied the chemical procedure to the synthesis of two new oxime derivatives, namely 6-(5-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde oxime (K1281) (**19**) and 6-(5-(4-benzhydrylpiperazin-1-yl)pentyl)-3-hydroxypicolinaldehyde oxime (K1358) (**20**). The design of **19** was inspired by the motif from **18**, namely the 6,7-dimethoxy-1-phenyl-3,4-dihydroisoquinoline moiety, which by a reduction approach yielded the 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline core. This alteration led to an overall molecular weight decrease to introduce more drug-likeness into **19**, with retained lipophilic character for potential BBB permeation by passive diffusion. The 4-benzhydrylpiperazin-1-yl moiety in **20** was selected to anchor the bulky site of AChE, *i.e.* PAS in a plausibly more favorable way compared to **18**.

Compounds **17** and **18** have been previously reported by Renard *et al.* [12, 13c], but their overall synthetic yields

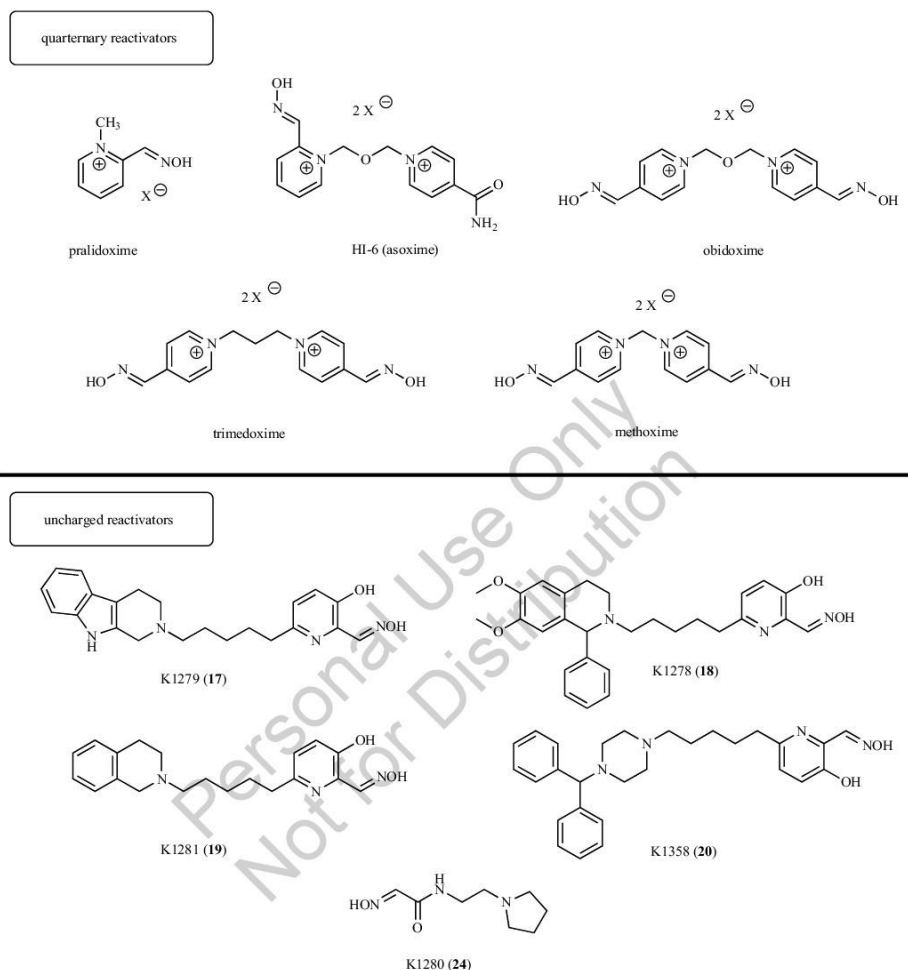
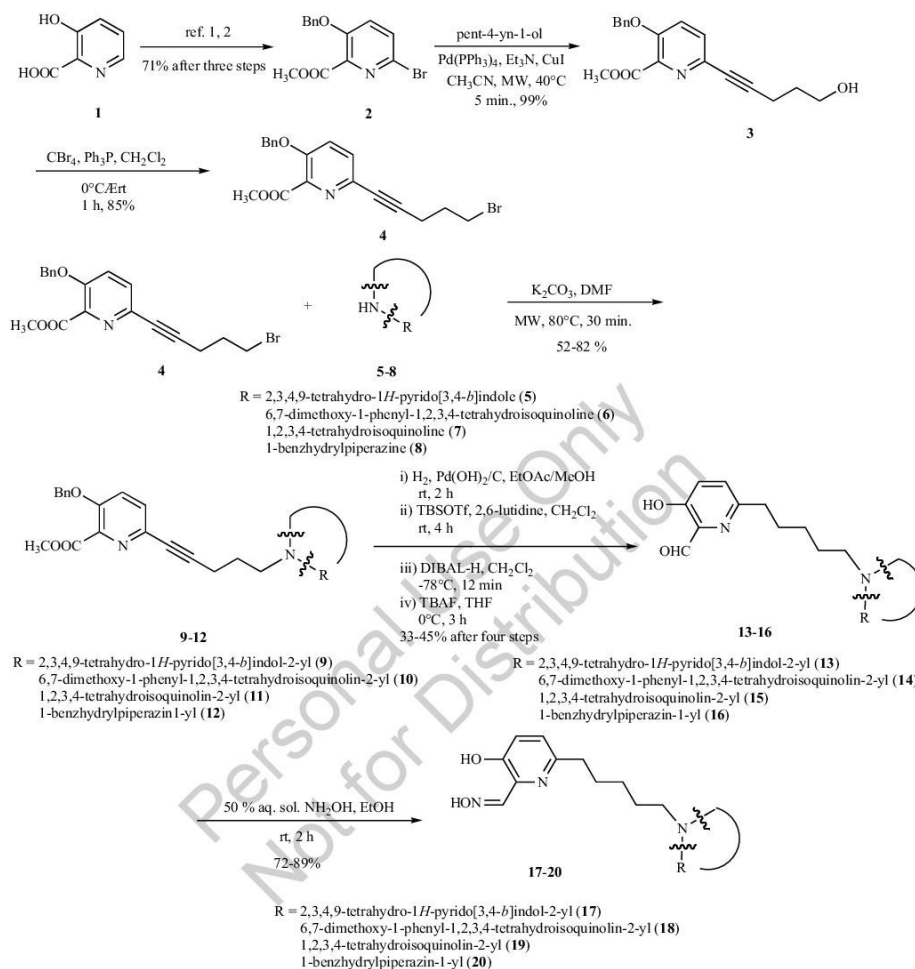


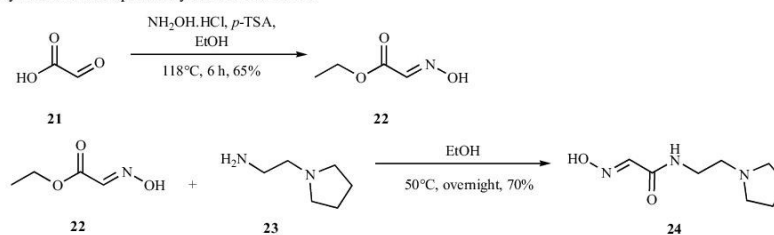
Fig. (1). Currently available pyridinium-based reactivators with uncharged reactivators explored in the study.

were low (1.3% and 7.3% for **17** and **18** over 11 and 10 steps, respectively) [12, 13c]. This highlights the difficulty of preparing these products on a large scale as standards for *in vivo* testing. Herein, we report improved reaction conditions resulting in increased overall yields of the uncharged reactivators. To shorten the reaction time, we have exploited a microwave system for some reaction steps. In general, **17** and **18** were prepared in yields of 16.5% and 13.3% respectively after 11 steps in both cases. In addition, we have also developed two novel uncharged aldoximes, **19** and **20** in overall yields of 12.9%, and 8.3%, both after 11 reaction

steps (Scheme 1). The synthetic approach leading to compound **24** has already been published (Scheme 2) [17a]. In the case of this oxime reactivator we have followed the reported procedure, obtaining almost the same results. The first step consisted in simultaneous esterification and introduction of the oxime group to afford ethyl 2-(hydroxyimino)ethanoate (**22**) in good yield (65%). In the second step, acyl substitution of intermediate **22** by commercially available 1-(2-aminoethyl)pyrrolidine (**23**) provided the final product **24** in slightly lower yield (70%) than that published in the literature.



Scheme 1. Synthesis of non-quaternary reactivators 17-20.



Scheme 2. Synthesis of non-quaternary reactivator 24.

Table 1. ADMET properties predicted using in silico ADMET predictor software.

Compound	S+logD	S+Peff	S+MDCK	DiffCoef	LogBB	Vd	PrUnbnd	Rat_Acute LD50 (mg/kg)	Rat_TD50 (mg/kg/day)	Mouse_TD50 (mg/kg/day)
Obidoxime	-5.02	0.56	2.52	0.77	-1.26	0.78	100.0	540	24	1075
Trimexime	-5.22	0.55	14.6	0.75	-1.25	1.08	100.0	513	9	163
Methoxime	-5.54	0.58	23.6	0.82	-1.19	0.81	100.0	464	26	982
Pralidoxime	-3.19	0.73	94.7	1.14	-0.68	0.84	100.0	358	33	516
Asoxime	-5.27	0.34	2.4	0.77	-1.39	0.87	100.0	686	46	69
K1278	5.44	5.80	19.0	0.56	-0.49	1.77	0.74	410	23	57
K1279	3.23	2.51	9.6	0.65	-0.39	3.7	4.67	380	40	377
K1280	-0.94	1.85	29.4	0.97	-0.32	1.00	78.4	480	17	975
K1281	3.51	3.38	20.7	0.67	-0.05	3.29	6.22	456	50	97
K1358	4.63	2.50	11.9	0.56	0.01	4.82	2.03	477	30	964

S+ indicates software predicted parameter. Octanol-water distribution coefficient (S+logD), human jejunal effective permeability (S+Peff, cm/s $\times 10^{-4}$), apparent MDCK permeability (S+MDCK, cm/s $\times 10^{-6}$), molecular diffusion coefficient in water (DiffCoef, cm/s $\times 10^3$), logarithm of the blood-brain partition coefficient (S+LogBB), volume of distribution (Vd, L/kg), percentage unbound to blood plasma proteins (S+PrUnbnd, in %), LD₅₀ - the lethal rat acute toxicity-lethal dose in 50% of rats (mg/kg), TD₅₀ - the oral dose of a compound required to induce toxic effect in 50 percent of a rat or mouse population after exposure over a standard lifetime (mg/kg/day).

Starting from 3-hydroxypicolinic acid **1**, successive reactions, namely esterification, bromination and protection by a benzyl group were performed according to known procedures [12, 13c]. This afforded **2** in 71% yield after three steps (Scheme 1). Subsequently, a microwave-accelerated Sonogashira coupling was performed in CH₃CN at 40 °C for 5 minutes to obtain aromatic alkyne **3** in excellent yield (99%). The reaction time was shortened under these conditions, whereas pursuant to the reported protocol the reaction was carried out in CH₂Cl₂ at room temperature overnight [13c]. The alcohol **3** was converted to the corresponding bromide **4** by Appel reaction with CBr₄ and Ph₃P. The next step was the nucleophilic substitution of the cyclic amines **5-8** with bromide **4**. To shorten the reaction time, coupling was carried out under the microwave conditions at 80 °C in DMF affording intermediates **9-12**. A sequence of four reaction steps was conducted with intermediates **9-12** according to the described procedure in the following order [13c]: i) catalytic hydrogenation of the alkyne and the deprotection of the benzyl group, one pot., ii) formation of the TBS ether, iii) reduction of the methyl ester to the corresponding aldehyde using DIBAL-H, iv) deprotection of the TBS group with TBAF to give aldehydes **13-16** in 33-45% yields after these four steps. The last step was the addition-elimination reaction of the aldehyde group with NH₂OH (50% aqueous solution) to generate the final aldoxime derivatives **17-20** (Scheme 1). To conclude our chemical data, the final uncharged reactivators **17-20** were obtained in overall yields of 16.5% (**17**) 13.3% (**18**) 12.9% (**19**) and 8.3% (**20**) after 11 reaction steps in sufficient quantity for *in vitro* and also *in vivo* evaluation. The structures of all compounds were determined by ¹H and ¹³C NMR analysis and by HRMS. Based on LC with UV detection ($\lambda = 254$ nm), the purity of the final products **17-20** was $\geq 95\%$.

Details on the organic syntheses are given in the Experimental section.

4. RESULTS

4.1. In silico Prediction of ADME and Toxicological Properties

Employing *in silico* prediction, we confirmed that all tertiary amines except K1280 (K1358, K1278, K1279 and K1281) have log $D_{7.4}$, which favors transmembrane permeability across the BBB. By contrast, quaternary oximes have log $D_{7.4}$ range from -5.5 to -3.2. These *in silico* data correlate well with our experimental results (Table 2). *In silico*, all non-quaternary compounds were predicted to have good permeability across MDCK cells (S+MDCK) or human jejunum (S+Peff), as well as across the blood-brain barrier (BBB) as determined by the LogBB coefficient (Table 1). In the MDCK model, compounds with permeability (P_{app} (A-B)) $> 3 \times 10^{-6}$ cm/s have high brain potential to enter the CNS, and compounds with P_{app} (A-B) $< 1 \times 10^{-6}$ cm/s are have very low penetration across the BBB [19]. With respect to logBB interpretation, CNS-permeable compounds have logBB ≥ 0.3 , by contrast, in non-permeable compounds logBB is negative and lower than -0.3 [20]. Although K1278, K1279 and K1280 have logBB values only slightly below the threshold value of -0.3, other parameters refer to their potential BBB permeation. Interestingly, some quaternary oximes with low molecular weight have shown also good permeability in the MDCK cellular model of trans-epithelial transport, such as 2-PAM, trimedoxime, methoxime, ranging from 14.5 to 94.7 cm/s $\times 10^{-6}$. However, these predictions are not confirmed by experimental findings in the PAMPA assay, MDCK assay (see below) nor by *in vivo* evaluation [7]. Some tertiary amines with high logD such as

Table 2. pK_a , $\log P$ and $\log S$ values for standard oximes and uncharged reactivators. Results are the mean of at least three independent measurements. * Values obtained by *in silico* prediction by ADMET Predictor. ** Interval predicted due to very high and very low experimental water solubility for K1280 and K1279 respectively.

Compound	$pK_{a1} \pm SD$	$pK_{a2} \pm SD$	$pK_{a3} \pm SD$	$pK_{a4} \pm SD$	$\log P \pm SD$	$\log S$
Pralidoxime	7.88 ± 0.01	-	-	-	-2.81*	-2.48*
Obidoxime	7.63 ± 0.05	8.33 ± 0.10	-	-	-4.61*	-3.48*
Trimedoxime	7.97 ± 0.01	8.62 ± 0.03	-	-	-4.42*	-3.53*
Asoxime	7.36 ± 0.03	-	-	-	-5.03*	-3.29*
Methoxime	7.32 ± 0.02	8.13 ± 0.00	-	-	-5.03*	-3.50*
20 (K1358)	8.15 ± 0.04	-	3.63 ± 0.05	8.05 ± 0.11	5.26 ± 0.04	-6.84
19 (K1281)	8.16 ± 0.06	-	3.54 ± 0.06	8.70 ± 0.06	4.19 ± 0.01	-4.26
24 (K1280)	8.79 ± 0.01	-	-	8.71 ± 0.05	0.04 ± 0.01	> -3.65**
17 (K1279)	8.13 ± 0.03	-	3.36 ± 0.10	8.02 ± 0.08	4.37 ± 0.05	< -5.71**
18 (K1278)	8.12 ± 0.01	-	3.31 ± 0.10	7.77 ± 0.09	4.99 ± 0.02	-5.367

K1358 and K1278 have very high plasma protein binding (higher than 97%) which might be a potential obstacle in distribution and transfer across the BBB (see Table 1). However, compounds K1279, K1280 and K1281 ($\log D$ ranges from -0.9 to 3.5) have satisfactory BBB permeability and satisfactory free drug plasma concentration (at least 2% of free unbound compound) for potential drug candidates. *In silico* analyses using ADMET Predictor also indicate the negative affinity of all tested quaternary and tertiary amines to the major BBB efflux transporter P-glycoprotein [19b], indicating that this factor does not favor non-quaternary compounds over quaternary ones (*data not shown*). Our predictions also clearly demonstrate that the more lipophilic compounds (K1278, K1279, K1281 and K1358) will be widely distributed in the body and in fat tissues as indicated by high V_d parameters (Table 1). This distribution will extend the body half-life and also decrease the plasma concentrations of these compounds.

In the *in-silico* toxicity analyses, we found very low predicted risk of toxicity or mutagenicity for these compounds (*data not shown*). Some compounds displayed some risk of cardiotoxicity as indicated by a plausible interaction with the hERG potassium ion channel (*e.g.* asoxime and K1281). This risk was independent of the tertiary or quaternary amine status in the tested compounds, and does not seem to be connected strongly with the oxime moiety. All analyzed compounds have relatively high LD_{50} and TD_{50} values in rats or mice, which are independent of charge in the molecule (Table 1).

In conclusion, with respect to the prediction of ADME properties, compound K1280 seems to be a good drug candidate.

4.2. Determination of Physicochemical Properties

The physicochemical properties of AChE reactivators play a key role in the reactivation of the enzyme. The dissociation constant (pK_a) indicates the ratio between the ionized and un-ionized form at a given pH. The un-ionized state to-

gether with lipophilicity of the compound ($\log P$) and its solubility ($\log S$) are essential parameters determining the bioavailability and distribution within the body. Hence we have determined the pK_a of the standard reactivators as well as pK_a , $\log P$ and $\log S$ values of our novel uncharged reactivators, to compare and predict their druggability in the human organism (Table 2).

For several compounds more than one pK_a value was detected, as a result of their chemical structures. Bispiperidinium-oxime reactivators (asoxime, methoxime, trimedoxime, obidoxime) have two pK_a values (pK_{a1} , pK_{a2}). Non-quaternary reactivators have another one or two pK_a values corresponding to the basic groups in their structures (pK_{a3} , pK_{a4}). Due to their very high water-solubility and hydrophilicity, $\log P$ and $\log S$ of quaternary reactivators were not determined, and were only evaluated by *in silico* prediction.

The pK_a (A) values of the novel non-quaternary reactivators K1278, K1279, K1281 and K1358 are in the recommended range of pK_a 7.00 - 8.35, which ensures good reactivation capability at physiological pH [21]. However, the pK_a value of K1280 is slightly outside of this recommended range. Further, $\log P$ data showed that K1278, K1279, K1281 and K1358 are quite lipophilic, in contrast to the standard quaternary oximes and K1280 (> 41.5 mg in 1 ml).

As K1278, K1279, K1281 and K1358 have identical oxime moieties, it seems that the reactivation potency is not solely dependent on this fragment, and that the non-oxime moiety also plays an important role in this property. The basic moiety probably affects formation of the oximate as well as the affinity of the reactivator for the anionic binding site of the enzyme [22].

4.3. *In vitro* Anti-Cholinesterase Assay

All the newly-synthesized compounds exhibited a low inhibitory activity towards cholinesterases (Table 3). The most potent inhibitors were asoxime for AChE and prali-

Table 3. Inhibitory activity of pyridinium-based and non-quaternary oxime reactivators towards native AChE and BChE expressed as the IC₅₀ values ± SEM (n=3), or % of inhibition at the highest concentration tested (10 μM), marked by*. Compound K1280 showed no effect even at higher concentration than 10 μM, marked by**.

Compound	hAChE IC ₅₀ ± SEM (μM)	hBChE IC ₅₀ ± SEM (μM)
Pralidoxime (2-PAM)	217 ± 17	138 ± 12
Obidoxime	197 ± 8	5440 ± 552
Asoxime (HI-6)	47.7 ± 5.3	1950 ± 257
Methoxime	556 ± 29	1870 ± 200
Trimedoxime	278 ± 20	2552 ± 754
K1279	19%*	0%*
K1278	35%*	0%*
K1280	0%**	0%*
K1281	19%*	0%*
K1358	15%*	0%*

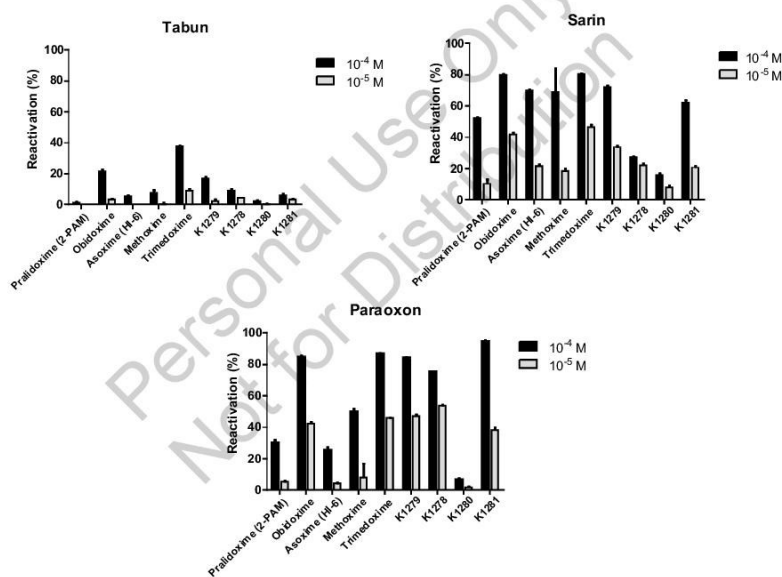


Fig. (2). Overall reactivation potency of quaternary and non-quaternary oxime reactivators against AChE inhibited by tabun, sarin and paraoxon at concentrations of 100 μM and 10 μM after 10 min. Values showed as the mean ± SEM (n=3).

doxime for BChE. Methoxime showed only marginal inhibitory activity for AChE. In cases where the IC₅₀ value was not determined due to limited solubility, the inhibition is presented as a percentage at the highest concentration tested, *i.e.* 10 μM. Except for 2-PAM, the ability of all the pyridinium-based reactivators to inhibit BChE was less pronounced compared to AChE, being expressed mostly in the mM range. The highest feasible concentration in this experimental setup (10 μM) for non-quaternary oximes resulted in no inhibition of BChE.

4.4. In vitro Assay of Reactivation Potency

Standard oximes obidoxime and trimedoxime (10⁻⁴ M, 10⁻⁵ M) showed the highest reactivation potency for sarin-inhibited human AChE from the whole set of the tested compounds (Fig. 2). Trimedoxime (10⁻⁴ M = 37.9%, 10⁻⁵ M = 9.0%) was the best reactivator for tabun-inhibited AChE. Note that K1279, the most effective non-quaternary oxime, achieved 16.7% ability at 10⁻⁴ M, and was more potent for instance than pralidoxime. Obidoxime and trimedoxime

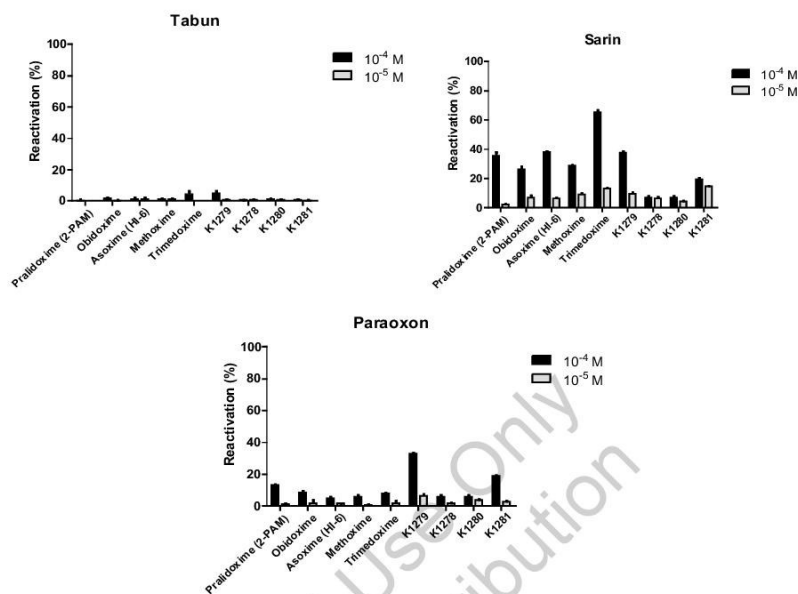


Fig. (3). Overall reactivation potency of quaternary and non-quaternary oxime reactivators against BChE inhibited by tabun, sarin and paraoxon at concentrations of 100 μ M and 10 μ M after 10 min. Values showed as the mean \pm SEM (n=3).

were found potent for paraoxon-inhibited human AChE, but nevertheless were surpassed by reactivator K1281 which showed excellent results in reactivation of hAChE inhibited by this organophosphate (94.9% at 10^{-4} M). However, the reactivation abilities of K1279, K1278, trimedoxime and obidoxime were similar and almost as effective as K1281. A similar trend was observed at the lower tested concentration (10^{-5} M).

None of the quaternary reactivators is able to satisfactorily reactivate tabun-inhibited BChE, K1279 is the best of the non-quaternary oximes, although the reactivation was no higher than 10%. A similar situation can be observed for paraoxon-inhibited BChE, where non-quaternary reactivators K1279 and K1281 showed better reactivation potency than the standard oximes. Trimedoxime followed by pralidoxime, asoxime and K 1279 were the best oximes for reactivation of BChE inhibited by sarin (Fig. 3).

4.5. Cytotoxicity and Prediction of BBB Penetration

All the reactivators under study were inspected for their potential cytotoxic effect on renal and hepatic cell lines (Table 4). Non-quaternary oximes (K1278, K1279, K1281 and K1358) generally possessed a more cytotoxic profile than the pyridinium-based oximes for both tested cell lines. The cytotoxicity of the novel non-quaternary compounds, except for K1280, lies in the micromolar range. However, the limited solubility does not allow an accurate IC_{50} determination in most of the cases. The analogs bearing a 3-

hydroxypyridinaldoxime fragment were found to possess similar IC_{50} values (K1278, K1279, K1358) of about 1 μ M. On the other hand, the *N*-substituted 2-hydroxyiminoacetamide K1280 did not influence cell viability at a concentration around 2 mM, which can be ascribed to its lower lipophilicity. No substantial difference was observed for different cell lines.

In the PAMPA assay, the penetration across the blood brain barrier (BBB), expressed as the *Pe* value, was correlated with standard CNS-available and unavailable drugs. Our data showed a high resemblance to previously reported penetrations of standard drugs as well as with general knowledge about the availability in the CNS *in vivo* [23]. The assay predicted good penetration for non-quaternary compounds K1278, K1279 and K1281. Oxime K1280 showed a lower probability to permeate BBB, although this can be categorized as uncertain, as the *Pe* value is higher than that of the non-permeable standards (atenolol and piroxicam) but lower than that of CNS-available drugs (tacrine and donepezil).

In the assay employing MDCK cell we evaluated also the possibility of active transport over the cell monolayer as have been suggested by the *in silico* model. In this model compounds showing $P_{app} > 3 \times 10^{-6}$ cm/s have high brain potential to enter the CNS, and compounds with $P_{app} < 1 \times 10^{-6}$ cm/s are have very low penetration across the BBB [19]. Studied compounds followed the trend of the PAMPA evaluation and data obtained for quaternary obidoxime,

Table 4. Cytotoxic effects of the standard oxime reactivators expressed as IC_{50} . (95% confidence interval are not shown), and the prediction of their blood-brain barrier penetration expressed as $Pe \pm SEM$ (n=2-3).

Compound	Cytotoxicity (IC_{50}/mM)		Prediction of BBB Penetration			
	ACHN	HepG2	PAMPA Assay Pe ($\times 10^{-6} cm s^{-1}$) $\pm SEM^*$	CNS(+/-)	MDCK Papp ($\times 10^{-8} cm s^{-1}$) $\pm SEM$	CNS(+/-)
obidoxime	5.47	4.28	0.68 \pm 0.09	CNS -	1.0 \pm 0.3*	CNS -
trimedoxime	18.34	8.50	0.073 \pm 0.017	CNS -	0.4 \pm 0.2*	CNS -
methoxime	1.31	1.28	0.25 \pm 0.13	CNS -	0*	CNS -
pralidoxime	19.52	25.68	0.36 \pm 0.16	CNS -	0*	CNS -
asoxime	8.90	3.08	0.84 \pm 0.19	CNS -	0*	CNS -
K1278	0.002	0.001	5.4 \pm 0.8	CNS +	31.8 \pm 5**	CNS +
K1279	> 0.001	>0.001	5.7 \pm 1.2	CNS +	20.8 \pm 7.8**	CNS +
K1280	> 2	>2	2.4 \pm 0.1	CNS +/-	1.5 \pm 1.2**	CNS -
K1281	0.011	0.012	6.9 \pm 0.2	CNS +	11.6 \pm 1.8**	CNS +
K1358	> 0.001	> 0.001	N.D.	N.D.	N.D.**	N.D.
donepezil	N.T.	N.T.	7.3 \pm 0.9	CNS +	16.2 \pm 1.1*	CNS +
tacrine	N.T.	N.T.	3.75 \pm 0.49	CNS +	25.4 \pm 3.4*	
atenolol	N.T.	N.T.	1.02 \pm 0.37	CNS -	N.T.	N.T.
piroxicam	N.T.	N.T.	2.2 \pm 0.15	CNS -	N.T.	N.T.

N.T. not tested, N.D. not determined due to solubility reasons, when the solubility was below the limit of detection of the UV/VIS method. * stands for data obtained spectrophotometrically, ** stands for data obtained using HPLC/MS detection.

trimedoxime, pralidoxime and for non-quaternary K1280 are in high contrast of software prediction listed above. Whereas CNS availability of those compounds is predicted by the *in silico* model, both PAMPA and MDCK assays experimentally denied this suggestion. In general, both assayed confirmed the hypothesis that quaternary oximes are not able to cross the BBB, non-quaternary are (with exception of K1280).

In both methods applied, the compound K1358 was not assessed due to low solubility in the assay medium, which meant that it was below the detection limit of both the UV/VIS spectrophotometry and LC/MS detection.

5. DISCUSSION

The concept of non-quaternary reactivators [12] has been developed to ensure the protection of the central compartment, which is barely affected by either atropine or the classic quaternary reactivators such as obidoxime and asoxime (HI-6). On the other hand, non-quaternary reactivators are associated with several drawbacks which result from their lipophilicity [11]. Low solubility, difficulty with parenteral application, lower reactivation ability and higher toxicity are often discussed in such particular cases. Hence we have taken five representatives of non-quaternary and five repre-

sentatives of quaternary reactivators and compared *in vitro* their basic parameters, those crucial for potential treatment of OP poisoning.

The ability of a reactivator to form an ionized oximate at physiological pH is important for successful reactivation. On the other hand, the un-ionized state, together with its lipophilicity (logP) and solubility (logS), is essential for passive diffusion of a compound through biological membranes. If we consider parenteral application, such property is essential for crossing of the blood-brain barrier. Based on previous SAR studies, the recommended pK_a values for the oxime group are 7.00-8.35, when at least 10% of oximate is present at pH 7.4 [21]. Except for K1280, all tested reactivators fit into this range. Indeed, the evaluation of reactivation potency at pH 7.4 confirmed potent reactivation ability of both subsets. However, K1280 having the highest pK_a (8.79) was the least effective reactivator. To summarize reactivation data, the set of quaternary oximes showed better efficacy against sarin and tabun than non-quaternary oximes and approximately the same efficacy has been observed in the case of paraoxon. Notably, compound K1280 showed weak reactivation potency. It is important to accept that reactivation is probably not the only mechanism responsible for protection, and other non-reactivating factors play an

important role [24]. Compound K1358 was not soluble at the tested concentrations, and hence its reactivation ability was not assessed. This leads to another issue associated with non-quaternary oximes, which is the water solubility. Log P results show that K1278, K1279, K1281 and K1358 are highly lipophilic, and as such are presumed to achieve good penetration through biological membranes. However, the poor solubility in water impedes administration of the drug. Moreover, highly lipophilic compounds bind significantly to plasma proteins, which results in a low free fraction of the compound for distribution across the BBB or to other tissues (Table 1). Very low water solubility also limits *in vitro* evaluation, as in the case of K1358, and makes practically impossible the *in vivo* validation and parenteral application required for fast onset during OP poisoning. In contrast, K1280 possesses better solubility in water (> 41.5 mg in 1 ml), and based on the ADME predictors it can be regarded as a promising centrally-bioavailable candidate. However, this prediction was not confirmed in the PAMPA evaluation, where good penetration for the non-quaternary compounds K1278, K1279 and K1281 was proposed, whereas oxime K1280 was found to be hampered with uncertain permeability probably due to its low lipophilicity (log P = 0.04). Even though the correlations between higher lipophilicity and increased permeability have been established, lipophilicity itself is not always predictive of permeability [25]. Furthermore, some quaternary oximes (2-PAM, trimesoxime, methoxime) were software-predicted for good permeability in the MCDK cellular model of trans-epithelial transport [19]. However, these predictions were not at all confirmed by experimental findings in the PAMPA and MDCK assays, nor by *in vivo* experiments [7]. Standard charged reactivators showed low P_e values, which mean that these standard drugs cannot be administered *per os* [26], and they scarcely penetrate to the brain [7, 27]. In a further development, based on the *in silico* predictions, attention needs to be paid to compounds with log P closer to the reported optimal value for CNS active drugs (log P -2.1, <3) and with lower molecular weight (below 310) [19b, 28].

Even though *in silico* prediction has not revealed substantial differences between the acute toxicity of quaternary and non-quaternary oximes, lipophilicity is an important factor from the toxicological point of view [29]. Lipophilic compounds are more persistent (possessing higher V_d) in the organism and thus may accumulate and later redistribute. There is also a higher probability of toxic metabolite formation in the case of lipophilic drugs, as these have higher propensity to be metabolized [30]. Furthermore, lipophilic compounds have a higher affinity for any hydrophobic regions of proteins, which results in off-targeting and may lead to side effects [29]. In our study, we examined the cytotoxicity of both subsets on both renal and hepatic cells. Even though there is no clear correlation between acute toxicity and cytotoxicity, there was an apparent correlation between lipophilicity and cytotoxicity. While classic quaternary oximes exert cytotoxicity in the millimolar range, non-quaternary oximes displayed anti-proliferation activity in the micromolar range. In some cases, the cytotoxic IC $_{50}$ value was not reached, due to low solubility.

The toxicity of reactivators may also be associated with their affinity to AChE. Whilst affinity of AChE reactivators to AChE is essential for the reactivation process, oxime reactivators should not be strong cholinesterase inhibitors themselves, as this may aggravate the toxic symptoms [31]. Correlation of the inhibitory activities of the quaternary and non-quaternary subsets to AChE is hampered by the fact that non-quaternary oximes have limited solubility, and the concentration required to inhibit the enzyme by 50% (IC $_{50}$) could not be achieved. By simple extrapolation of the inhibition obtained at 10 μ M we can observe that non-quaternary oximes using a peripheral site anchor have higher inhibitory activity to AChE than quaternary ones, and thus may represent a higher risk for native AChE. Higher affinity to AChE would be plausible in the case of excellent reactivation potency, but such conclusion could not be drawn from the presented data. The lower reactivation rate of OP-inhibited BChE probably reflects lower affinity for this enzyme.

CONCLUSION

Non-quaternary and quaternary oxime reactivators represent opposite ends of a spectrum. *In vitro* evaluation of classic charged oximes and representatives of recently-published uncharged reactivators indicates that uncharged oximes do not offer extraordinary reactivation potency, but without doubt they represent a higher toxicity risk. Whether protection of the central compartment will outweigh the risks associated with lipophilic compounds must be definitively determined *in vivo*. However, even parenteral the administration of such lipophilic drugs is problematic. More likely, balanced physicochemical properties will be required for the successful treatment of OP poisoning. Nevertheless, one such compound pinpointed by *in silico* assessment and evaluated in this study (K1280) failed in this particular case. From the presented data, the concept of uncharged reactivators will have to be improved, at least in respect of bioavailability and the prerequisites for administration *in vivo*.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No Animals/Humans were used for studies that are base of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the grant of Grant Agency of the Czech Republic No. 15-16701S. The authors

are grateful to Ian McColl MD, PhD for assistance with the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

REFERENCES

- [1] Quinn, D.M. Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.*, **1987**, *87*, 955-979.
- [2] Chang, F.-C.T.; Foster, R.E.; Beers, E.T.; Rickett, D.L.; Filbert, M.G. Neurophysiological concomitants of soman-induced respiratory depression in awake, behaving guinea pigs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1990**, *102*, 233-250.
- [3] Bajgar, J. Organophosphates/nerve agent poisoning: Mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv. Clin. Chem.*, **2004**, pp. 151-216.
- [4] (a) Kassa, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, **2002**, *40*, 803-16; (b) Gorecki, L.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Nepovimova, E.; Malinak, D.; Kucera, T.; Dolezal, R.; Jun, D.; Soukup, O.; Kuca, K. Progress in acetylcholinesterase reactivators and in the treatment of organophosphorus intoxication: A patent review (2006-2016). *Expert. Opin. Ther. Pat.*, **2017**, *27*(9), 971-985.
- [5] Zwart, R.; Vijverberg, H.P. Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: Competitive and noncompetitive effects. *Mol. Pharmacol.*, **1997**, *52*, 886-895.
- [6] Sakurada, K.; Matsubara, K.; Shimizu, K.; Shiono, H.; Seto, Y.; Tsuge, K.; Yoshino, M.; Sakai, I.; Mukoyama, H.; Takatori, T. Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.*, **2003**, *28*, 1401-1407.
- [7] Lorke, D.; Kalasz, H.; Petroianu, G.; Tekes, K. Entry of oximes into the brain: a review. *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 743-753.
- [8] Musilek, K.; Dolezal, M.; Gunn-Moore, F.; Kuca, K. Design, evaluation and structure-activity relationship studies of the AChE reactivators against organophosphorus pesticides. *Med. Res. Rev.*, **2011**, *31*, 548-75.
- [9] Amitai, G.; Gez, R.; Ravch, L.; Bar-Ner, N.; Grauer, E.; Chapman, S. Novel bifunctional hybrid small molecule scavengers for mitigating nerve agents toxicity. *Chem Biol. Interact.*, **2016**, *259*, 187-204.
- [10] (a) Korabecny, J.; Soukup, O.; Dolezal, R.; Spilovska, K.; Nepovimova, E.; Andrs, M.; Nguyen, T.D.; Jun, D.; Musilek, K.; Kucerova-Chlupacova, M.; Kuca, K. From pyridinium-based to centrally active acetylcholinesterase reactivators. *Mmi Rev. Med. Chem.*, **2014**, *14*, 215-21; (b) Gorecki, L.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Malinak, D.; Nepovimova, E.; Dolezal, R.; Jun, D.; Soukup, O.; Kuca, K. SAR study to find optimal cholinesterase reactivator against organophosphorus nerve agents and pesticides. *Arch. Toxicol.*, **2016**, *90*, 2831-2859.
- [11] Voicu, V.A.; Medvedovici, A.V.; Sakurada, K.; Ohta, H.; Rădulescu, F.Ş.; Miron, D.S. The forgotten or underestimated relevance of biopharmaceutical-based assessments for the oral absorption studies of oxime reactivators. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2016**, *12*, 743-752.
- [12] Mercey, G.; Verdet, T.; Saint-André, G.; Gillon, E.; Wagner, A.; Baati, R.; Jean, L.; Nachon, F.; Renard, P.-Y. First efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of poisoned human acetylcholinesterase. *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 5295-5297.
- [13] (a) Mercey, G.; Renou, J.; Verdet, T.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Gillon, E.; Arboléas, M.; Loiodice, M.; Nachon, F.; Jean, L. Phenyltetrahydroquinoline-pyridinaldoxime conjugates as efficient uncharged reactivators for the dephosphorylation of inhibited human acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 10791-10795; (b) Renou, J.; Mercey, G.; Verdet, T.; Păunescu, E.; Gillon, E.; Arboléas, M.; Loiodice, M.; Kliachyna, M.; Baati, R.; Nachon, F. Syntheses and *in vitro* evaluations of uncharged reactivators for human acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Chem. Biol. Interact.*, **2013**, *203*, 81-84; (c) Renou, J.; Loiodice, M.; Arboléas, M.; Baati, R.; Jean, L.; Nachon, F.; Renard, P.-Y. Tryptoline-3-hydroxypyridinaldoxime conjugates as efficient reactivators of phosphorylated human acetyl and butyrylcholinesterases. *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 3947-3950; (d) Kliachyna, M.; Santoni, G.; Nussbaum, V.; Renou, J.; Sanson, B.; Colletier, J.-P.; Arboléas, M.; Loiodice, M.; Weik, M.; Jean, L. Design, synthesis and biological evaluation of novel tetrahydroacridine pyridine-aldoxime and-amidoxime hybrids as efficient uncharged reactivators of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *78*, 455-467.
- [14] Calas, A.-G.; Dias, J.; Rousseau, C.; Arboléas, M.; Touvre-Loiodice, M.; Mercey, G.; Jean, L.; Renard, P.-Y.; Nachon, F. An easy method for the determination of active concentrations of cholinesterase reactivators in blood samples: Application to the efficacy assessment of non quaternary reactivators compared to HI-6 and pralidoxime in VX-poisoned mice. *Chem. Biol. Interact.*, **2017**, *267*, 11-16.
- [15] Wei, Z.; Liu, Y.-q.; Zhou, X.-b.; Luo, Y.; Huang, C.-q.; Wang, Y.-a.; Zheng, Z.-b.; Li, S. New efficient imidazolium aldoxime reactivators for nerve agent-inhibited acetylcholinesterase. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 5743-5748.
- [16] (a) de Koning, M.C.; van Groel, M.; Noort, D. Peripheral site ligand conjugation to a non-quaternary oxime enhances reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Toxicol. Lett.*, **2011**, *206*, 54-59; (b) De Koning, M.; Joosen, M.; Noort, D.; Van Zuylen, A.; Tromp, M. Peripheral site ligand-oxime conjugates: A novel concept towards reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterase. *Biorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 588-594.
- [17] (a) Sit, R.K.; Radić, Z.; Gerardi, V.; Zhang, L.; Garcia, E.; Katalinić, M.; Amitai, G.; Kovarik, Z.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B. New structural scaffolds for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*, 19422-19430; (b) Kovarik, Z.; Macek, N.; Sit, R.K.; Radić, Z.; Fokin, V.V.; Sharpless, K.B.; Taylor, P. Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE. *Chem. Biol. Interact.*, **2013**, *203*, 77-80; (c) Radić, Z.; Sit, R.K.; Kovarik, Z.; Berend, S.; Garcia, E.; Zhang, L.; Amitai, G.; Green, C.; Radić, B.; Fokin, V.V. Refinement of structural leads for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *J. Biol. Chem.*, **2012**, *287*, 11798-11809.
- [18] (a) Kalisiak, J.; Ralph, E.C.; Zhang, J.; Cashman, J.R. Amidine-oximes: Reactivators for organophosphate exposure. *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 3319-3330; (b) Kalisiak, J.; Ralph, E.C.; Cashman, J.R. Nonquaternary reactivators for organophosphate-inhibited choline-sterases. *J. Med. Chem.*, **2011**, *55*, 465-474.
- [19] (a) Wang, Q.; Rager, J.D.; Weinstein, K.; Kardos, P.S.; Dobson, G.L.; Li, J.; Hidalgo, J.J. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int. J. Pharm.*, **2005**, *288*, 349-359; (b) Rankovic, Z. CNS drug design: balancing physicochemical properties for optimal brain exposure. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 2584-2608.
- [20] Muehlbacher, M.; Spitzer, G.M.; Liedl, K.R.; Kornhuber, J. Qualitative prediction of blood-brain barrier permeability on a large and refined dataset. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **2011**, *25*, 1095-1106.
- [21] Musil, K.; Florianova, V.; Bucek, P.; Dohnal, V.; Kuca, K.; Musilek, K. Development and validation of a FIA/UV-vis method for pK a determination of oxime based acetylcholinesterase reactivators. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **2016**, *117*, 240-246.
- [22] Andre, G.; Kliachyna, M.; Kodepelly, S.; Leriche, L.; Gillon, E.; Renard, P.; Nachon, F.; Baati, R.; Wanger, A. Design, synthesis and evaluation of new α -nucleophiles for the hydrolysis of organophosphorus nerve agents: application to the reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 6352-6361.
- [23] Di, L.; Kerns, E.H.; Fan, K.; McConnell, O.J.; Carter, G.T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, *38*, 223-232.
- [24] (a) Hamilton, M.G.; Lundy, P.M. HI-6 therapy of soman and tabun poisoning in primates and rodents. *Arch. Toxicol.*, **1989**, *63*, 144-9; (b) Soukup, O.; Jun, D.; Tobin, G.; Kuca, K. The summary on non-activation cholinergic properties of oxime reactivators: The interaction with muscarinic and nicotinic receptors. *Arch. Toxicol.*, **2013**, *87*, 711-719; (c) van Helden, H.P.M.; Busker, R.W.; Melchers, B.P.C.; Brijnzel, P.L.B. Pharmacological effects of oximes: how relevant are they. *Arch. Toxicol.*, **1996**, *70*, 779-786.

- [25] Avdeef, A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr. Top. Med. Chem.*, **2001**, *1*, 277-351.
- [26] Maksimović, M.; Jovanović, D.; Kovačević, V.; Bokunjić, D. Oral kinetics and bioavailability of the cholinesterase reactivator HI-6 after administration of 2 different formulations of tablets to dogs. *Toxicol. Lett.*, **1987**, *39*, 85-91.
- [27] Karasová, J.Ž.; Zemek, F.; Kassa, J.; Kuča, K. Entry of oxime K027 into the different parts of rat brain: Comparison with obidoxime and oxime HI-6. *J. Appl. Biomed.*, **2014**, *12*, 25-29.
- [28] Pajouhesh, H.; Lenz, G.R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx*, **2005**, *2*, 541-553.
- [29] Price, D.A.; Blagg, J.; Jones, L.; Greene, N.; Wager, T. Physicochemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes: A review. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2009**, *5*, 921-931.
- [30] Alavijeh, M.S.; Chishty, M.; Qaiser, M.Z.; Palmer, A.M. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx*, **2005**, *2*, 554-571.
- [31] Bartosova, L.; Kuca, K.; Kunesova, G.; Jun, D. The acute toxicity of acetylcholinesterase reactivators in mice in relation to their structure. In: *Neurotoxicity Research*, Springer New York: **2006**, Vol. 9, pp. 291-296.

Personal Use Only
Not for Distribution

Publikace 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15

Míra zapojení autora dizertační práce:

- stanovení predikce penetrace skrz HEB PAMPA metodou
- vyhodnocení dat včetně statistického zpracování

Publikace 10

Míra zapojení autora dizertační práce:

- spolupráce na rešeršní činnosti