

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 prostup 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 obnovujících 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 prostup 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