

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



**LC-MS/MS studie I. fáze *in vitro* biotransformace potenciálních léčiv působících  
v terapii Alzheimerovy nemoci**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Aneta Kuřátková

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Martin Novák

Hradec Králové, 2021

# ABSTRAKT

Doposud nebyla nalezena léčba, která by zcela zastavila progresi Alzheimerovy nemoci. Dříve používaný takrin měl v terapii Alzheimerovy choroby dobré výsledky, nicméně dlouhodobé užívání vedlo k chronické hepatotoxicitě způsobené jeho metabolity.

Tato diplomová práce se zabývá sloučeninou 7-fenoxytakrin, která je jedním z nadějných substituovaných derivátů takrinu a mohla by být jedním z kandidátů pro potenciální využití v terapii Alzheimerovy choroby. Z důvodu vzniku hepatotoxických metabolitů takrinu po biotransformaci v játrech se jeví jako nezbytné u molekuly 7-fenoxytakrinu identifikovat jeho vznikající metabolity. V rámci diplomové práce byla provedena *in vitro* biotransformační studie 7-fenoxytakrinu za použití lidských jaterních mikrosomů. Pro stanovení parentní látky a vznikajících sedmnácti metabolitů byla využita technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Výsledky ukázaly vznik šesti monohydroxylovaných a jedenácti dihydroxylovaných metabolitů 7-fenoxytakrinu. Hydroxylace je tedy hlavní metabolická reakce po *in vitro* mikrosomální biotransformaci. Kromě identifikace metabolitů byla v rámci této diplomové práce provedena i kvantifikační a mikrosomálně stabilitní studie zahrnující stanovení úbytku parentní látky v čase. Dále byl stanoven biologický poločas a intrinsic clearance 7-fenoxytakrinu, z čehož vyplynulo, že se jedná o sloučeninu, kterou lze zařadit mezi rychle biotransformované molekuly.

# ABSTRACT

No treatment that would completely stop the progression of Alzheimer's disease has not been found yet. Recently used tacrine showed good results in the treatment of Alzheimer's disease, however long-term use led to chronic hepatotoxicity due to its metabolites.

This master thesis deals with the compound 7-phenoxytacrine, one of the promising tacrine derivatives, which is one of the candidates for potential use in the therapy of Alzheimer's disease. Due to the formation of hepatotoxic metabolites of tacrine after the biotransformation in human liver, it appears necessary to identify the emerging metabolites of 7-phenoxytacrine molecule. Within this master's thesis *in vitro* biotransformation study of 7-phenoxytacrine using human liver microsomes was performed. High performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry was used to determine the parent substance and the seventeen 7-phenoxytacrine metabolites. The analytical method showed the formation of six monohydroxylated and eleven dehydroxylated metabolites of 7-phenoxytacrine. Thus, we concluded that hydroxylation is the major metabolic reaction after *in vitro* microsomal biotransformation. In addition to the identification of metabolites, a quantification and microsomal stability study, including the determination of the amount of parent substance after biotransformation in defined time points, was performed. Furthermore, the biological half-life and intrinsic clearance of 7-phenoxytacrine were determined and we classified this compound to the group of rapidly biotransformed molecules.

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

V Hradci Králové dne .....

.....

(podpis autorky)

# PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc. Mé poděkování patří i Mgr. Martinu Novákovi za ochotu, trpělivost a odborné rady při realizaci měření a další cenné rady při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Centru biomedicínského výzkumu při FN Hradec Králové za poskytnutí laboratoří a veškerého vybavení, bez kterého by měření nemohlo být realizováno. Tato práce byla vypracována za podpory projektu SVV 260 547.

# OBSAH

<b>Obsah</b>	<b>6</b>
<b>Seznam obrázků</b>	<b>8</b>
<b>Seznam tabulek</b>	<b>11</b>
<b>1 Teoretická část</b>	<b>12</b>
1.1 Alzheimerova choroba .....	12
1.1.1 Definice, etiologie .....	12
1.1.2 Patofyziologie .....	12
1.1.3 Konvenční léčba .....	14
1.1.4 Takrin .....	15
1.1.5 Takrinové deriváty .....	16
1.2 Metabolizace léčiv .....	18
1.2.1 Biotransformace .....	18
1.2.2 Biotransformační enzymy .....	19
1.2.3 I. fáze biotransformace .....	22
1.2.4 II. fáze biotransformace .....	23
1.2.5 Metabolismus takrinu .....	24
1.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie .....	25
1.3.1 Základní charakteristika .....	25
1.3.2 Instrumentace HPLC .....	26
1.4 Hmotnostní spektrometrie (MS) .....	28
1.4.1 Základní charakteristika MS .....	28
1.4.2 Instrumentace MS .....	29
1.4.3 Ionizační techniky .....	30
1.4.4 Hmotnostní analyzátory .....	34

1.4.5	Hmotnostní detektory .....	38
1.4.6	Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	38
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b>	<b>42</b>
3.1	Biologický materiál.....	42
3.2	Chemikálie .....	42
3.3	Pracovní a zásobní roztoky .....	43
3.4	Technické vybavení .....	43
3.5	Popis zkoumané látky .....	45
3.6	Metodika experimentu .....	46
3.6.1	Identifikační a kvantifikační experimenty .....	47
3.6.2	Mikrosomálně stabilitní experiment .....	48
3.7	LC-MS analýza .....	49
3.8	Vyhodnocení.....	51
3.8.1	Vyhodnocení identifikačních experimentů.....	51
3.8.2	Vyhodnocení kvantifikační a mikrosomálně stabilitní studie.....	52
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuse</b>	<b>53</b>
4.1.1	Identifikační experiment .....	53
4.1.2	Kvantifikační experiment .....	74
4.1.3	Mikrosomálně stabilitní studie.....	76
<b>5</b>	<b>Závěr</b>	<b>79</b>
	<b>Seznam citované literatury</b>	<b>80</b>
	<b>Seznam symbolů, veličin a zkratk</b>	<b>86</b>

# SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Struktura molekuly: a) donepezilu b) galantaminu c) rivastigminu. ....	14
Obr. 2. Struktura memantinu. ....	15
Obr. 3. Struktura takrinu. ....	15
Obr. 4. Struktura 7-fenoxytakrinu. ....	17
Obr. 5. Zastoupení biotransformačních enzymů v těle (převzato z [20]). ....	19
Obr. 6. Jaterní buňka (převzato a upraveno dle [22]). ....	20
Obr. 7. Schéma metabolismu takrinu. ....	25
Obr. 8. Základní schéma HPLC systému (převzato a upraveno z [34]). ....	27
Obr. 9. PRM záznam 7-fenoxytakrinu. ....	29
Obr. 10. Zdroj elektronové ionizace (převzato z [45], str. 16). ....	31
Obr. 11. Přehled využití API v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu včetně schématického zobrazení jednotlivých iontových zdrojů (převzato z [48]). ....	32
Obr. 12. Schématické zobrazení elektrospreje (převzato a upraveno dle [49]). ....	33
Obr. 13. Schéma zapojení kvadrupólu upraveno dle [56]. ....	35
Obr. 14. Uspořádání elektrod v kvadrupólové iontové pasti (převzato a upraveno dle [57]). ....	36
Obr. 15. Schéma trojitého kvadrupólu (převzato a upraveno dle [66]). ....	39
Obr. 16 Schéma Q-Orbitrapu (převzato z [68]). ....	40
Obr. 17 Struktura vnitřního standardu 7-(4-chlorfenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-aminu. ....	43
Obr. 18 Struktura 7-fenoxytakrinu. ....	45
Obr. 19 Experimentálně stanovená izotopická obálka 7-FEOTY. ....	46
Obr. 20 Schéma gradientu 30 minutové metody v rámci identifikačního experimentu 1.	



.....	49
Obr. 21 Schéma gradientu optimalizované 50minutové identifikační metody (experiment 2).....	50
Obr. 22 Schéma gradientu 10minutové kvantifikační metody. ....	50
Obr. 23 Schéma gradientu metody pro mikrosomálně stabilitní studii (experiment 4)..	51
Obr. 24 Experimentálně stanovený chromatogram 7-FEOTY. ....	54
Obr. 25 MassFrontierem navržené struktury fragmentů 7-FEOTY. ....	55
Obr. 26 PRM spektrum 7-fenoxytakrinu. ....	56
Obr. 27 Navržené struktury fragmentů 7-FEOTY.....	57
Obr. 28 Chromatogram 7-fenoxytakrinu včetně označených pravděpodobných metabolitů. ....	57
Obr. 29 Předpokládané vznikající mono- a dihydroxylované metabolity 7-fenoxytakrinu. ....	58
Obr. 30 EIC záznam monohydroxylových metabolitů o $m/z = 307,1441$ . ....	59
Obr. 31 Fragmentační spektra metabolitů M1, M2, M3 a M5 s označenými nejintenzivnějšími fragmenty. ....	60
Obr. 32 Navržené struktury fragmentů M1, M2, M3 a M5.....	61
Obr. 33 Navržená struktura fragmentu $m/z = 246,09991$ vyskytující se ve spektru M1.	62
Obr. 34 Hydroxylované 7-fenoxytakriny s určenou ClogP. ....	63
Obr. 35 Fragmentační spektrum M4 a M6. ....	64
Obr. 36 Přehled navržených struktur fragmentů M4 a M6.....	65
Obr. 37 Navržené struktury monohydroxylovaných metabolitů. ....	66
Obr. 38 EIC dihydroxylovaných metabolitů o $m/z = 323,13901$ .....	66
Obr. 39 Fragmentační spektra M7 – M11.....	68
Obr. 40 Navržené sktruktury fragmentů metabolitů M7 – M11.....	69
Obr. 41 Fragmentační spektra metabolitů M12 – M14. ....	70

Obr. 42	Fragmentační spektra metabolitů M15 – M17. ....	71
Obr. 43	Navržené struktury fragmentů společné pro metabolity M12 – M17. ....	72
Obr. 44	Navržené struktury fragmentů typických pro M13. ....	72
Obr. 45	Fragment $m/z = 260,10742$ typický pro M14 a M15. ....	73
Obr. 46	Navržené struktury fragmentů metabolitů M16 a M17. ....	73
Obr. 47	Navržené struktury dihydroxylovaných metabolitů. ....	74
Obr. 48	Graf kalibrační křivky 7-FEOTY vytvořený z dat z hmotnostního spektrometru. .....	75
Obr. 49	Graf nárůstu intenzity metabolitu M1. ....	75
Obr. 50	Graf nárůstu intenzity metabolitu M9. ....	76
Obr. 51	Graf závislosti poměru ploch pod píkem na inkubačním čase. ....	77

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Enzymy II. fáze biotransformace (čerpáno z [31]).....	24
Tab. 2 Přehled ionizačních technik.....	30
Tab. 3 Instrumentální složení kapalinového chromatografu. ....	44
Tab. 4 Přehled jednotlivých experimentů prováděných v rámci diplomové práce. ....	46
Tab. 5 Složení kontrolních vzorků.....	47
Tab. 6 Složení kontrolních vzorků v experimentu č. 4.....	48
Tab. 7 Parametry HPLC metody.....	49
Tab. 8 Přehled retenčních časů M12 – M17. ....	70
Tab. 9 Hodnoty biologického poločasu a intrinsic clearance standardů a 7-FEOTY.....	78

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

Tato kapitola pojednává o teoretickém podkladu k Alzheimerově chorobě a metabolismu léčiv. Dále je zde rozebrána vysokoúčinná kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

## 1.1 Alzheimerova choroba

### 1.1.1 Definice, etiologie

Alzheimerova choroba (AD – Alzheimer Disease) je nevléčitelné progresivní neurodegenerativní onemocnění. Jde o nejběžnější formu demence postihující zejména osoby vyššího věku. Věk je tedy jeden z rizikových faktorů, kdy choroba postihuje téměř 47 % osob nad 85 let [1]. Mezi další rizikové faktory se řadí komorbidita (mrtvice, srdeční choroby, hypercholesterolémie, diabetes), kouření, genetika [2], chronický stres, zánět, chronická bolest [1], rodinná anamnéza a obezita [3].

Projevuje se zhoršením kognitivních funkcí a poruchou paměti. Mezi další příznaky patří porucha řeči, deprese, apatie, změna chování a osobnosti. Jde o multifaktoriální onemocnění, kde hlavní příčina doposud není známa, proto se léčí symptomaticky [4].

Dle výroční zprávy České alzheimerovské společnosti z roku 2019 trpí v České republice Alzheimerovou demencí kolem 180 000 lidí [5]. Dle WHO (World Health Organisation) pak v Evropě kolem sedmi miliónů a celosvětově až padesát miliónů pacientů [6]. Odhaduje se, že v roce 2050 bude incidence AD dosahovat až 150 miliónů [7].

### 1.1.2 Patofyziologie

Patofyziologie Alzheimerovy choroby není doposud zcela objasněna, existuje však několik teorií. Vznik a průběh AD bude pravděpodobně způsoben kombinací více faktorů.

#### a) Snížená cholinergní transmise:

Z patofyziologického hlediska dochází ke snížení cholinergní transmise, konkrétně ke snížení uvolňování acetylcholinu a k deficitu exprese nikotinových a muskarinových receptorů. Za rozklad acetylcholinu jsou zodpovědné cholinesterázy, které se v centrální

nervové soustavě vyskytují ve dvou typech – acetylcholinesteráza (AChE) a butyrylcholinesteráza (BChE) [2].

#### **b) Tvorba proteinu $\beta$ -amyloidu:**

Onemocnění se rovněž projevuje tvorbou extracelulárního proteinu  $\beta$ -amyloidu ( $A\beta$ ).  $\beta$ -amyloid je protein složený z 37–43 aminokyselin. Mezi jeho nejběžnější izoformy patří  $A\beta_{1-40}$  a  $A\beta_{1-42}$ .  $A\beta_{1-42}$  je možné zařadit mezi nejvíce neurotoxické izoformy, protože vykazuje největší potenciál agregace [4].  $A\beta$  vzniká degradací amyloidového prekurzorového proteinu APP (amyloid precursor protein) pomocí enzymů  $\beta$ -sekretázy (BACE-1 – Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) nebo  $\gamma$ -sekretázy [3]. Jeho tvorba a akumulace je tedy jednou z možných příčin AD.  $A\beta$  je spojen s řadou mechanismů, které se podílí na poškození neuronů, s nimiž souvisí i oxidační stres, který vzniká inhibicí mitochondriálních enzymů  $\beta$ -amyloidem. Dochází k poruše elektronového transportu, produkce ATP (adenosintrifosfát) a k poškození mitochondriální membrány, což může vést k uvolnění volných radikálů kyslíku. Dále  $A\beta$  ovlivňuje hladiny kovů jako je železo, měď anebo zinek, které opět vedou k tvorbě reaktivních forem kyslíku. Rovněž vyšší koncentrace železa potencuje fosforylaci a agregaci proteinu  $\tau$ . Navíc zvýšené hladiny vápníku vedou ke zvýšené tvorbě  $A\beta$  a jeho agregaci [4].

#### **c) Tvorba neurofibrilárních klubek:**

Další hypotéza zmiňuje tvorbu neurofibrilárních klubek v průběhu AD, které jsou tvořeny lineárně uspořádanými mikrotubuly spletenými s proteinem  $\tau$ . Tyto spleteně je následně možno nalézt v mozkových buňkách. Protein  $\tau$  je mikrotubul-asociovaný fosfoprotein, který v defosforylovaném stavu umožňuje správné sestavení mikrotubulů. Během AD je naopak protein  $\tau$  v hyperfosforylovaném stavu, čímž se snižuje jeho afinita k mikrotubulům a zvyšuje se množství jeho volné frakce. Následuje agregace do spárovaných spirálových vláken, což má za následek poruchu axonálního transportu. Posttranslační modifikace proteinu  $\tau$  jako je fosforylace, glykace nebo síťování je katalyzováno transglutaminázou (TGáza). TGáza se běžně vyskytuje v organismu, nicméně během AD vykazuje výrazně zvýšenou aktivitu. Dále katalyzuje přeměnu neuronálních cytoskeletálních proteinů (včetně proteinu  $\tau$ ) v nerozpustnou matrix, která je rezistentní vůči většině proteolytických enzymů [2].

Tato amyloid- $\beta$  a  $\tau$  protein hypotéza převažuje nad cholinergní hypotézou, kdy

právě kumulace těchto proteinů může být jedním ze zásadních faktorů AD [4]. Zvýšené oxidativní poškození, zánět anebo nevyvážená homeostáze kovů jsou faktory přispívající k patofyziologii a vážnému průběhu AD [3].

Z morfologického hlediska dochází k atrofii mozkové tkáně v důsledku úbytku neuronů a k degradaci synapsí, zejména v oblasti hipokampu, což je právě oblast související s lidskou pamětí a se schopností prostorové orientace [1].

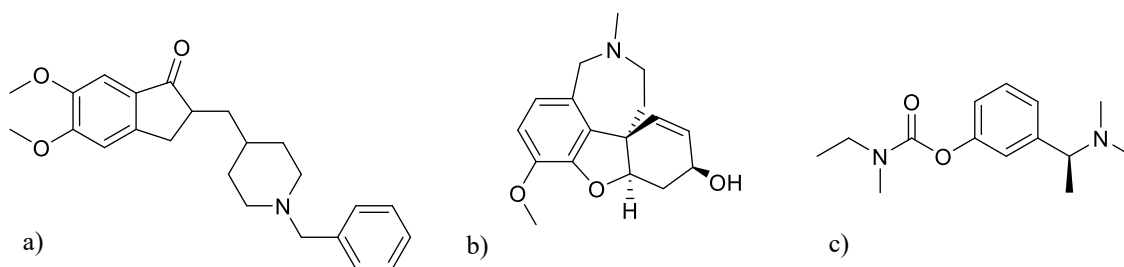
#### d) Mikroglie a astrocyty v patogenezi AD:

Předpokládá se, že zánět hraje roli při ztrátě neuronů. Podle studií bylo zjištěno, že mikroglie interagují s A $\beta$  a ovlivňují jeho hladinu v mozku [8].

Mikroglie jsou makrofágy působící v nervové soustavě, které se jako první podílí na imunitní reakci při zánětu nebo úrazu mozku. Jejich hlavní funkcí je monitorování CNS (centrální nervové soustavy) a detekce patogenů. Účastní se na prezentování antigenu T-buňkám a navíc produkují široké spektrum neuroprotektivních látek. Existují dva fenotypy mikroglie – M1, které produkcí prozánětlivých cytokinů ničí patogeny a M2, které naopak působí protizánětlivě a hrají roli v reparaci tkáně [8].

### 1.1.3 Konvenční léčba

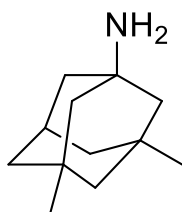
Kvůli doposud neznámé příčině nemoci se Alzheimerova choroba léčí pouze symptomaticky, kdy tento způsob léčby nevede k vyléčení onemocnění, pouze průběh nemoci zpomaluje. V terapii mírné až středně závažné AD se používají inhibitory acetylcholinesterázy (AChE). Inhibicí tohoto enzymu je zabráněno hydrolýze acetylcholinu (ACh) na cholin a acetát. Nedochází tedy k zásadnímu poklesu hladiny ACh. Do skupiny AChE inhibitorů řadíme léčiva – donepezil, rivastigmin, galantamin a historicky také takrin [4]. Struktury používaných léčiv jsou zobrazeny na Obr. 1.



Obr. 1 Struktura molekuly: a) donepezilu b) galantaminu c) rivastigminu.

Memantin (Obr. 2) lze na základě mechanismu účinku zařadit do skupiny

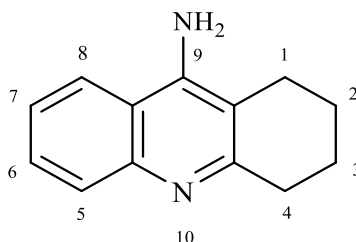
blokátorů NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartat) receptorů. Obsazením receptoru memantinem je zabráněno toku vápníku do buňky, ke kterému běžně dochází při aktivaci receptoru glutamátem [3]. Při nadměrné aktivaci NMDA receptoru glutamátem dochází k excitotoxicitě, která v důsledku nadměrného množství vápníku v buňce způsobuje poškození nervových buněk [9].



Obr. 2. Struktura memantinu.

#### 1.1.4 Takrin

Takrin neboli 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin je reverzibilní nekompetitivní inhibitor acetylcholinesterázy (Obr. 3) [10].



Obr. 3. Struktura takrinu.

V roce 1945 byl takrin představen pro jeho účinnou schopnost inhibovat cholinesterázu a v roce 1993 byl FDA (Food and Drug Administration) schválen pro léčbu Alzheimerovy choroby, nicméně kvůli hepatotoxicitě byl následně v roce 2013 stažen z trhu [7].

Hepatotoxicita je zapříčiněna pravděpodobně působením hydroxylovaných derivátů takrinu vzniklých po metabolizaci v játrech mikrosomálním cytochromem P450 1A2. Za metabolit, který je nejvíce zodpovědným za hepatotoxicitu, je považován 7-hydroxytakrin [11].

Vzniklé metabolity vyvolávají reverzibilní zvýšení aktivit sérových transamináz – alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). Jaterní transaminázy se za fyziologických okolností vyskytují v jaterních buňkách a odrážejí jejich integritu. Jejich zvýšený výskyt v krvi nám tedy signalizuje poškození

hepatocytu. Mezi projevy hepatotoxicity takrinu patří také snížení hladiny glutathionu (GSH) a zároveň zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species) v jaterních buňkách. GSH je hlavním antioxidantem v savcích tkáních, proto jeho deplecí dochází k oxidativnímu stresu mající za následek poškození jater. Tělo se nedostatek GSH snaží vykompenzovat, proto po podání takrinu jsou zvýšené hladiny dvou prekurzorů GSH – glutaminu a glutamátu. Při oxidativním stresu jsou poškozovány fosfolipidy jakožto základní složky buněčných membrán. Porušení konstrukce a funkce membrán jaterních buněk má za následek jejich devastaci. Základními složkami fosfolipidů jsou cholin a fosfocholin, které po podání takrinu vykazují také zvýšenou hladinu signalizující nám poškození buněčných membrán [12]. Reaktivní metabolity dále působí na makromolekuly, např. na DNA nebo na proteiny, což může mít opět za následek poškození tkáně [11]. Takrin dále rozvrací protonový gradient mitochondrií a brzdí produkci ATP, což vede k mitochondriální dysfunkci. Mitochondriální dysfunkce má za následek uvolňování dalších ROS, což vyvolává oxidační stres, který poškozuje buněčné membrány, degraduje proteiny a ničí mitochondriální DNA. Mitochondriální destrukce a poškození buněk by mohl být hlavním mechanismem, který je základem hepatotoxicity takrinu [12].

Takrin je spojován s velkými farmakokinetickými interindividuálními variacemi. Předpokládá se, že to ovlivňuje účinnost i výskyt nežádoucích účinků u jednotlivých pacientů. Takrin má širokou tkáňovou distribuci (játra, ledviny, nadledviny a mozková tkáň), což se odráží v jeho velkém distribučním objemu. Po perorálním podání má nízkou biologickou dostupnost, o které se předpokládá, že je výsledkem rozsáhlého first-pass metabolismu, což znamená, že před vstupem do cirkulace je část léčiva biotransformována játry. Eliminační poločas je krátký, 1,5 až 2,5 hodiny po jedné perorální (p.o.) a intravenózní (i.v.) dávce. Při opakovaných p.o. a i.v. dávkách je eliminační poločas 2,9 až 3,6 hodiny [13].

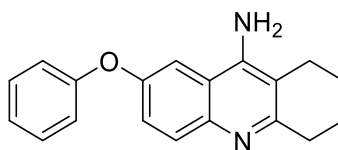
### **1.1.5 Takrinové deriváty**

Takrin díky jeho významné inhibici AChE, nízké molekulární hmotnosti a schopnosti redukovat neurotoxicitu způsobenou A $\beta$ , je jednou z několika leading structures využívaných pro vývoj analogů. Hlavní snahou při vývoji analogů je předcházet nežádoucím účinkům prokázaným u takrinové molekuly [14]. Dalším



důvodem, proč se molekulou takrinu a jeho strukturálními obměnami zabývat, je výhoda jeho injekčního i orálního podání a schopnost procházet přes hematoencefalickou bariéru [15].

K předcházení hepatotoxicity takrinu byla vyvinuta molekula 7-fenoxytakrin (7-FEOTA), která je v současné době podrobována dalším studiím. 7-fenoxytakrin je duálně působící sloučenina, u které byl potvrzen neuroprotektivní účinek srovnatelný s memantinem. Působí jako inhibitor cholinesteráz, což bylo prokázáno modifikovanou Ellmanovou metodou během preklinických studií. Zároveň selektivně inhibuje podtyp NMDA receptorů, konkrétně podtyp GluN1/GluN2B a GluN1/GluN2A. Tento dvojitý účinek zajišťuje žádoucí farmakologický efekt. Specifická inhibice receptorů GluN1/GluN2 zabraňuje nežádoucímu účinku excitotoxicity a ischemie. Současně bylo prokázáno, že 7-FEOTA nezpůsobuje behaviorální nežádoucí účinky, jako je tomu u silných inhibitorů NMDA receptorů. Navíc nízkou expresí těchto subtypů v mozečku je možné zvýšit terapeutickou dostupnost a minimalizovat tak vedlejší účinky. 7-fenoxytakrin se vyznačuje i dobrou CNS dostupností, a to díky malé velikosti molekuly [16]. Chemická struktura 7-fenoxytakrinu je zobrazena na Obr. 4.



Obr. 4. Struktura 7-fenoxytakrinu.

Dalším potenciálním kandidátem na léčbu Alzheimerovy choroby je derivát takrinu 7-methoxytakrin (7-MEOTA). 7-MEOTA vykazuje anticholinergní aktivitu a zároveň prozatím nebyl klinickými studiemi potvrzen vážný nežádoucí účinek [17]. 7-MEOTA je nadále testována, nicméně již byla zjištěna nižší účinnost oproti 7-fenoxytakrinu [16].

### **Multi-target-directed ligands:**

Za zmínku stojí i multi-target-directed ligands (MTDLs) syntéza takrinových derivátů. Kvůli komplikované patogenezi AD spojenou s několika hypotézami, které se podílí na progresi nemoci, jsou MTDLs léčiva jednou z racionálních možností, jak bojovat proti Alzheimerově chorobě. MTDLs strategie předpovídá vývoj jedné molekuly, která působí na několik klíčových cílů souvisejících s etiopatogenezi AD [3].

Jde o léčiva, která jsou složená ze dvou farmakoforů s různým farmakologickým

účinkem. MTDLs mají několik výhodných vlastností jako je inhibice A $\beta$  agregace, nižší toxicita na různé typy buněk, nižší hepatotoxicita a schopnost redukce oxidativního stresu. Je zde ale problém s vysokou molekulovou hmotností způsobenou spojením více molekulárních celků, čímž se omezuje průchod přes hematoencefalickou bariéru [4].

MTDLs sloučeniny založené na struktuře takrinu jsou stále předmětem vývoje. Je snahou předcházet nežádoucím účinkům, které metabolity takrinu způsobují a zároveň zachovat jeho účinnost. Zjednodušeně jde o sloučeniny, kde takrin s dobrou schopností zpomalovat progresi onemocnění je pomocí linkeru napojen na farmakofor, který cílí na další systémy související s patofyziologií AD (např. na inhibitory BACE-1, ...).

Existují struktury na bázi takrinu působící jako inhibitory AChE a BChE (butyrylcholinesterázy) jako jsou např. hybridní molekuly takrinu a lophinu, případně takrinu s melatoninem, nebo také tetracyklické analogy takrinu. Dále takrin-8-hydroxyquinolin hybridi, kteří vykazují jak inhibiční aktivitu vůči cholinesterázám, tak i zároveň působí antioxidantně [10].

## 1.2 Metabolizace léčiv

### 1.2.1 Biotransformace

Biotransformace je proces, během kterého pomocí biotransformačních enzymů vzniká z parentní (výchozí) látky metabolit. Metabolit je látka jiné chemické struktury a o jiných chemicko-fyzikálních vlastnostech oproti parentní látce. Proto můžeme v organismu předpokládat odlišné chování metabolitu od parentní látky. Existuje nespočet metabolických cest, kterými mohou být léčiva biotransformována.

Metabolismus léčiv probíhá ve dvou fázích. Jedna látka může podléhat několika reakcím jak v první, tak i ve druhé fázi metabolizace, proto z jedné látky může vzniknout několik metabolitů. Tyto reakce mohou probíhat i obousměrně [18].

Je několik faktorů, které ovlivňují metabolizaci. Velký vliv na výsledek metabolizace má genetický polymorfismus, kde každý jedinec se může lišit kvalitativní i kvantitativní expresí genů pro biotransformační enzymy a ovlivnit tak buněčnou odpověď na danou látku. Genový polymorfismus se týká zejména cytochromů P450 – známe alespoň 58 různých lidských genů, které kódují odlišné cytochromální izoenzymy. Dalším faktorem je mezidruhový rozdíl. Každý druh může

na podanou látku reagovat jinak, což je dáno odlišnou enzymatickou výbavou jednotlivých druhů. U mužů a žen je taktéž metabolismus odlišný kvůli metabolickým a hormonálním rozdílům. Pokud je v těle přítomna další látka, např. léčivo, může to taktéž ovlivnit metabolizaci v důsledku vzájemných interakcí [19].

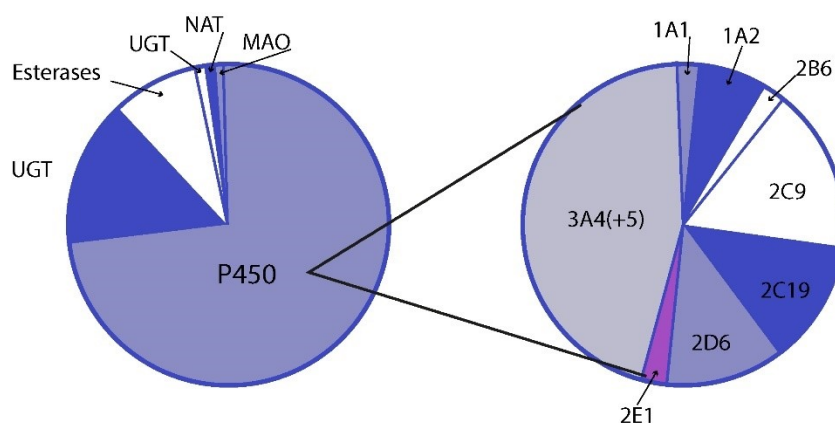
Metabolizace se s výhodou využívá u proléčiv, které se až po metabolizaci v organismu stávají aktivními [18].

## 1.2.2 Biotransformační enzymy

Biotransformační enzymy se podílí na metabolizaci xenobiotik včetně léčiv. Mění jejich chemickou strukturu přeměnou na hydrofilnější metabolit, čímž usnadní jejich eliminaci z organismu [19]. Struktura léčiva a enzymatická výbava organismu předurčuje, jak se bude léčivo v organismu chovat [18].

Největší množství těchto enzymů nalezneme v játrech, což je nejvýznamnější biotransformační orgán. Je to dáno nejčastějším vstupem látek do těla skrze trávicí trakt, odkud po absorpci do kapilárního řečiště tenkého střeva je krev odváděna prostřednictvím vena portae (vrátnicová žila) právě do jater [19].

Na Obr. 5 je znázorněné zastoupení biotransformačních enzymů podílejících se na metabolizaci léčiv v těle. Enzymy cytochromu P450 jsou hlavní biotransformační enzymy, z nichž nejhojněji je zastoupen CYP3A4. Dále se na metabolizaci podílí UGT (UDP-glukoronosyltransferáza), FMO (monooxygenáza obsahující flavin), NAT (N-acetyltransferáza) a MAO (monoaminoxidáza) [20].



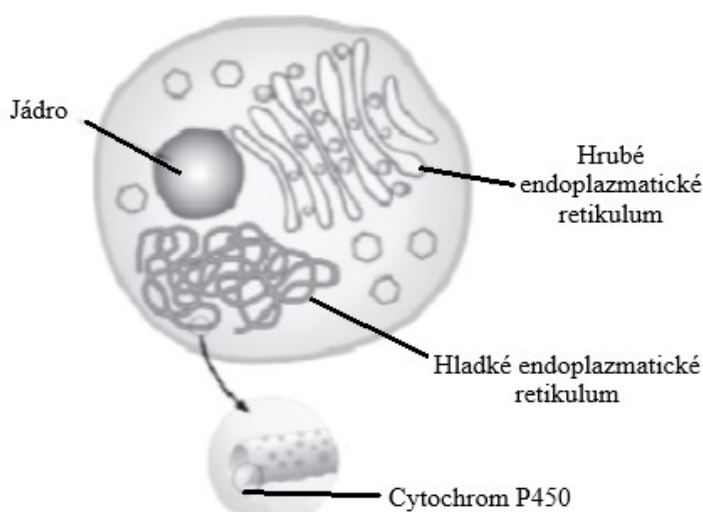
Obr. 5. Zastoupení biotransformačních enzymů v těle (převzato z [20]).

### Cytochrom P450:

Mezi hlavní enzymy I. fáze řadíme skupinu cytochromu P450 (CYP450).

Cytochrom P450 je hemoprotein, který se vyskytuje v několika izoformách. Je známo více jak 1000 izoform, zatímco většina jejich endogenních substrátů zůstává prozatím neznáma. CYP450 se v největší míře vyskytuje v jaterních buňkách (hepatocytech), nalezneme zde zejména izoformy CYP 3A4, 2C9, 2C8, 2E1 a 1A2. Dále se vyskytuje i v trávicím traktu, plicích a ledvinách. Lze v určité míře najít v každé tkáni. Nachází se taktéž napříč organismy, kromě lidské buňky ho nalezneme i v rostlinné buňce či bakterii. Nicméně zastoupení jednotlivých izoform není v každém organismu stejné. Na základě podobnosti sekvence aminokyselin v apoproteinu se cytochromy rozdělují do několika podskupin. Tato sekvence zároveň předurčuje substrátovou selektivitu [21]

V rámci buňky se CYP450 nachází na hladkém endoplazmatickém retikulu (SER), kde kromě části metabolismu lipidů a hemu, dochází také k metabolismu xenobiotik. Strukturálně je SER dlouhá nepravidelná organela trubcovitého tvaru, jejíž stěny jsou lipofilní a uzpůsobeny tak pro příjem lipofilních léčiv [22]. Na Obr. 6 je vyobrazen hepatocyt včetně hladkého endoplazmatického retikula, v jehož stěně je situován cytochrom.



Obr. 6. Jaterní buňka (převzato a upraveno dle [22]).

Cytochromy jsou složeny z apoproteinu (polypeptidový řetězec) a protoporfyrinu obsahující železo v centru porfyrinového kruhu. Na tento porfyrinový kruh je  $\text{Fe}^{3+}$  navázáno pomocí 4 vazeb. Na apoprotein je pak železo navázáno skrze thiolátový aniont a skrze šestou vazbu je regulovaná voda [18].

Enzymy cytochromu P450 katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce související nejen s transformací léčiv, ale i přírodních a endogenních látek [23].

Ve skutečnosti se jedná o monooxygenázy. Aby cytochromy mohly fungovat, potřebují kofaktor NADPH jako zdroj elektronů a CPR (cytochrom P450 reduktázu) pro jejich přenos [24]. Reakce začíná přenosem elektronů z NADPH na CPR, nebo na ferredoxinreduktázu a nehemový Fe-S protein v mitochondriích. Až poté se elektron přenesse na konkrétní cytochrom, který po vlastní redukci aktivuje molekulu kyslíku – jeden atom kyslíku je zanesen do molekuly substrátu a z druhého atomu vzniká voda [23].

Cytochromy jsou hlavním zdrojem variability ve farmakokinetice léčiv. Jsou popsány geneticky závislé variability jednotlivých aktivit a úrovní CYP450, které vysvětlují odpověď organismu na léky. Obecně alely způsobují buď defektní, kvalitativně pozměněné nebo snížené či zvýšené aktivity enzymů CYP450. Většina cytochromových enzymů je považována za geneticky polymorfní. Krom genetiky dále aktivitu enzymů ovlivňuje věk (s věkem metabolismus léčiv klesá), pohlaví, zdravotní status a v neposlední řadě induktory a inhibitory [21], [25]. Multialelické genetické polymorfismy, které silně závisí na etnickém původu, hrají roli ve funkci CYP2D6, 2C19, 2C9, 2B6, 3A5 a 2A1 a vedou k odlišným farmakogenetickým fenotypům, které bývají označovány jako pomalí, střední, extenzivní a ultrarychlí metabolizátoři [25].

Nejhojněji rozšířenou izoformou cytochromu P450 je CYP3A4, která se podílí na metabolizaci většiny léků, jejichž biotransformace je nám známá. Její aktivita je některými substancemi indukovatelná, např. rifampicinem, karbamazepinem, barbituráty nebo dexametasonem. Naopak může být i inhibována. Mezi inhibitory řadíme např. klarithromycin, erythromycin, ketokonazol, diltiazem anebo také grapefruitový džus [21], [24].

CYP2D6 je další z důležitých izoform cytochromu P450. Podílí se na metabolizaci 25 % léčiv na trhu. Například inhibitory této izoformy ovlivňují koncentraci antidepressiv, neuroleptik, antiarytmik a dalších. Je zde významný genetický polymorfismus, proto by u konkrétních jedinců mělo být individuálně nastavené dávkování léčiva, které se právě na izoformě 2D6 metabolizuje. Jedinci, s fenotypem označovaným jako ultrarychlý metabolizátor, by dávky měly být nastaveny vyšší než běžné terapeutické, aby se dávka léčiva v důsledku rychlé metabolizace pohybovala v terapeuticky účinném rozmezí, a ne pod ním. Naopak dávky pomalého metabolizátora by měly být nižší než běžné terapeutické, aby nedocházelo k intoxikaci vysokou

koncentrací léčiva způsobenou pomalou metabolizací xenobiotika [26].

Podrodina 2C je tvořena dvěma podstatnými izoforma 2C9 a 2C19. Podílí se na jaterní metabolizaci kolem 15 procent léčiv. Pro léčiva ze skupiny nesteroidních antiflogistik, kam patří např. diklofenak nebo ibuprofen je izoforma CYP2C9 zásadní. Warfarin, sartany (skupina léčiv snižující krevní tlak antagonistickým působením na receptor AT<sub>1</sub> pro angiotensin II) a progesteron jsou taktéž substráty CYP2C9 [27].

Z toxikologického hlediska je významná izoforma CYP2E1, která se podílí na metabolismu ethanolu [18].

Po metabolizaci léčiv mohou vznikat jak aktivní, tak i toxické metabolity. CYP450 se často účastní lékových interakcí, které mohou ovlivňovat hladinu léčiva v plazmě. I malá změna koncentrace léčiva v plazmě může pak způsobit vážné nežádoucí účinky. Z klinického pohledu je znalost jednotlivých cytochromů (včetně jejich substrátů, inhibitorů i induktorů) a jejich výskyt v organismu tedy nezbytná [24].

### 1.2.3 I. fáze biotransformace

Během I. fáze metabolizace dochází ke vzniku hydrofilnějších metabolitů, které se snadněji odstraňují z organismu. Dochází k tomu nejčastěji zavedením atomu kyslíku do sloučenin, čímž se sloučeniny stávají polárnějšími. Mezi reakce této fáze patří oxidace, redukce, hydratace, izomerace nebo pomocí hydrolytické reakce. Sloučeniny se stanou nejen více polární, ale jsou schopny podstoupit fázi II, tzv. konjugaci, čímž se stanou vysoce hydrofilními a usnadní se tím jejich eliminace z organismu. Sloučeniny, jejichž součástí je hydrofilní funkční skupina, mohou přímo podstoupit konjugační reakci [22].

Vzácností je, pokud metabolizací vznikne lipofilnější produkt. Je tomu tak např. u sulfonamidů, kdy N-acetylací vzniká ve vodě méně rozpustný acetylovaný metabolit, který může vykristalizovat v tubulech ledvin a způsobit krystalurii [28].

Na základě reakce, kterou enzymy katalyzují, může být I. fáze biotransformace dělena do tří kategorií – oxidace, redukce a hydrolýza [22].

#### **Oxidace:**

Oxidace jsou nejběžnější reakce I. fáze metabolizace zahrnující enzymy cytochromu P450 a monooxygenázy uvnitř mikrosomů. Vně mikrosomů působí monoaminoxidázy (MAO), diaminoxidázy (DAO) a xantinoxidáza (XO) [29]. Během

oxidace je látka hydroxylována, dealkylována, oxidačně deaminována, oxidačně dehalogenována nebo N- a S- oxidována. Popřípadě může docházet k oxidaci alkoholů a aldehydů.

Nejčastějším typem oxidace je hydroxylace. Zavedením hydroxylové skupiny do molekuly se sníží její lipofilita a dále bude molekula snadněji podléhat dalším konverzím nebo konjugačním reakcím [18]. Většina látek, které obsahují aromatické jádro podléhají aromatické hydroxylaci. Vzniká epoxid, ze kterého dále vzniká fenol [28]. Tyto reakce jsou nejčastěji katalyzována enzymy cytochromu P450.

#### **Redukce:**

Je pravděpodobné, že cytochromy dříve metabolizovaly látky pomocí redukce kvůli nedostatku kyslíku v rané fázi vývoje Země a až poté se jim vyvinula schopnost oxidace. V dnešních podmínkách je redukce méně častá. I tak se v těle vyskytují různé reduktázy (nitroreduktázy, ketoreduktázy, NADPH reduktázy), které metabolizují xenobiotika [22].

#### **Hydrolyza:**

V první fázi metabolizace může také docházet k hydrolyze, a to buď za pomoci enzymů (karboxylesteráza, pseudocholinesteráza, arylkarboxyesteráza, ...) nebo také neenzymově. Štěpnému metabolismu hydrolyzou podléhají zejména látky s estery a amidy ve své struktuře. Při této reakci se přidá molekula vody, kdy z původní látky vznikají dva samostatné metabolity. Tímto způsobem je např. metabolizován aspirin, prokain a enalapril. Hydrolyzovány mohou být i konjugáty vzniklé ve II. fázi metabolizace [29].

### **1.2.4 II. fáze biotransformace**

Tato fáze se vyznačuje konjugací s endogenní sloučeninou. Jednotlivé reakce jsou katalyzovány enzymy, které jsou uvedeny v Tab. 1.

Tab. 1 Enzymy II. fáze biotransformace (čerpáno z [31]).

Reakce	Enzym
Glukuronidace	UDP-glukuronosyltransferáza
Glukosidace	UDP-glukosyltransferáza
Sulfatace	Sulfotransferáza
Methylace	Methyltransferáza
Acetylace	Acetyltransferáza
Konjugace s glutathionem	Glutathion-S-transferáza

Konjugační enzymy atakují funkční skupiny, které buď vznikly v I. fázi metabolizace nebo se přirozeně vyskytují na molekule léčiva. Vznikají tak vysoce hydrofilní metabolity, které jsou snadno vylučitelné močí nebo žlučí. Tyto konjugační enzymy se podílí i na metabolizaci endogenních substrátů, mezi něž patří např. bilirubin, steroidy a biogenní aminy. Proto je možné očekávat, že xenobiotikum a endogenní sloučenina mohou soutěžit o stejný konjugační enzym [30].

#### **Glukuronidace:**

Glukuronidace je důležitá metabolizační a detoxikační dráha 45 až 75 % xenobiotik včetně klinicky používaných léčiv [31]. Reakce je katalyzována enzymem uridin-5'-difosfo(UDP)-glukuronosyltransferázou (UGT), který přenáší cukry (glukuronová kyselina, glukosa nebo xylitol) na aglykon [32]. UGTs jsou nadrodinou proteinů vázaných na membránu endoplazmatického retikula a u lidí jsou klasifikovány do čtyř podskupin – UGT1, UGT2, UGT3 a UGT8. Důležitým ko-substrátem je uridin-5'-difosfát- $\alpha$ -D-glukuronová kyselina (UDPGA) sloužící jako donor glukuronové kyseliny, která je přenesena na nukleofilní atom (preferovány jsou funkční skupiny – hydroxyl, fenol nebo acetyl) molekuly substrátu. Vzniklé glukuronidové konjugáty jsou exportovány skrze transportéry do žluče anebo moči [31].

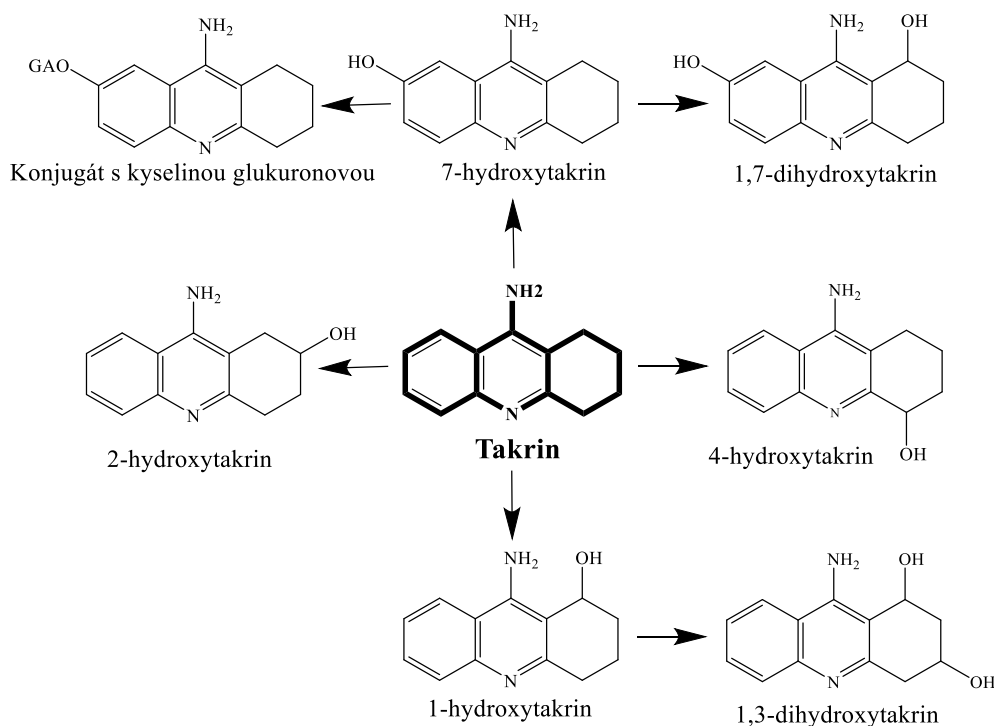
### **1.2.5 Metabolismus takrinu**

Studie metabolismu *in vitro* prokázaly význam cytochromu P450 (CYP1A2) v biotransformaci takrinu na 1-, 2-, 4- a 7- hydroxylované metabolity. U lidí byly identifikovány mono- a dihydroxylované konjugáty takrinu a glukuronidu. Primární cestou vylučování je pak moč [13].

V první fázi metabolizace je takrin hydroxylován, jejímž výsledkem jsou monohydroxylované a dihydroxylované metabolity. Hlavními metabolity takrinu



jsou 7-hydroxytakrin a 1-hydroxytakrin. 7-hydroxytakrin je považován za nejvíce toxický metabolit. V menší míře také vznikají metabolity 2- a 4-hydroxytakrin, a z dihydroxylovaných metabolitů vzniká 1,3- a 1,7-dihydroxytakrin. V druhé fázi metabolizace dochází nejčastěji ke konjugaci s kyselinou glukuronovou, popř. s kyselinou sírovou (viz Obr. 7) [11].



Obr. 7. Schéma metabolismu takrinu.

## 1.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

### 1.3.1 Základní charakteristika

HPLC je zkratka používaná pro vysokoučinnou kapalinovou chromatografii (angl. High performance liquid chromatography). Jde o jednu z chromatografických metod využívaných primárně pro separaci, identifikaci a kvantifikaci analytů jako jsou např. organické, anorganické, biologické nebo polymerní látky [33]. Je charakterizována téměř univerzálním použitím, širokou škálou zařízení, kolon a dalších materiálů, které jsou komerčně dostupné [34]. HPLC nalezne uplatnění ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu, v oblasti životního prostředí, v klinické oblasti (např. jedy, extrakty moči,...), ve forenzní chemii a biochemii, tudíž je součástí téměř každé laboratoře zabývající se analýzou chemických sloučenin [33].

Separace je založena na rozdílné distribuci mezi dvě nemísitelné fáze – stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Látky na základě rozdílné afinity ke stacionární fázi jsou v ní různě zadržovány, čímž dochází k rozdělení látek směsi v čase [35]. Vstup do pórů stacionární fáze je na základě difúze, retence je založena na specifických mezimolekulárních interakcích s povrchem sorbentu a nesespecifických interakcích látky s mobilní fází [36].

Mobilní fáze je pumpována ze zásobníku pomocí pumpy přes degasser do dávkovacího ventilu, který slouží pro nástřik vzorku. Po nástřiku je vzorek unášen mobilní fází na chromatografickou kolonu, kde probíhá samotná separace. Jednotlivé části vzorku putují z kolony dále do detektoru. Výsledný záznam se nazývá chromatogram [37].

K identifikaci látky se používá retenční čas, což je čas od nástřiku do maxima píku příslušné látky. Pro určení koncentrace látky ve vzorku se využívá tzv. plochy pod píkem. Se změnou koncentrace vzorku se retenční čas látek nemění, naopak ale dochází ke změně velikosti plochy pod píkem [34].

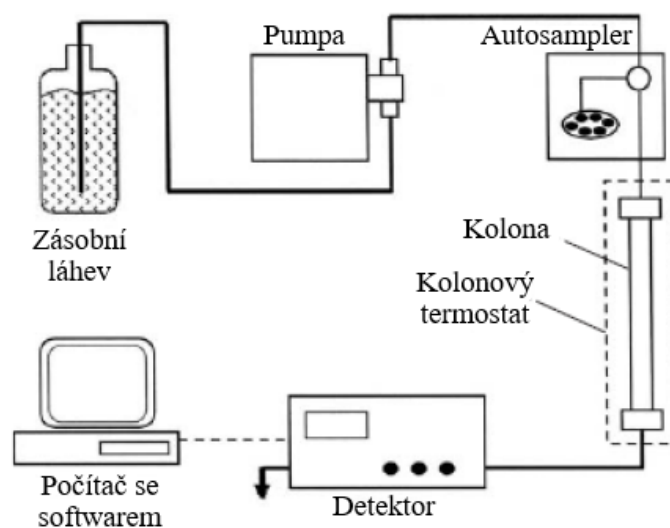
Rozlišujeme dva základní separační módy – NPC (normal phase chromatography), při kterém je kolona naplněna polární stacionární fází a protéká skrze ni nepolární mobilní fáze. Druhým, častěji využívaným módem (až 85 % aplikací [36]), je RPC (reverse phase chromatography), kde kolonou s nepolární stacionární fází protéká nejčastěji voda nebo pufr ve směsi s organickým rozpouštědlem [38].

Dále rozlišujeme dva druhy eluce – isokratickou a gradientovou. Během isokratické eluce se složení mobilní fáze v čase nemění, kdežto gradientová eluce se vyznačuje změnou procentuálního zastoupení složek mobilní fáze v průběhu analýzy [38]. Gradientová eluce je používanější a účinnější technikou, protože poskytuje lepší rozlišení a kapacitu separace než isokratická eluce [36].

### **1.3.2 Instrumentace HPLC**

V dnešní době je běžné, že komponenty HPLC systému jsou dodávány od jednoho výrobce jako celek. Výjimku tvoří např. MS detektory, které mohou být často dodávány i od jiných výrobců.

Zjednodušené schéma základních komponent HPLC systému je zobrazeno na Obr. 8.



Obr. 8. Základní schéma HPLC systému (převzato a upraveno z [34]).

Zásobník mobilní fáze je prostá součást HPLC systému, nejběžněji se jedná o skleněnou láhev, která je uzavřena šroubovacím uzávěrem tak, aby nedocházelo k postupnému vypařování mobilní fáze a zároveň, aby nedocházelo ke kontaminaci MF. Pro isokratickou eluci postačí pouze jedna láhev s mobilní fází, při gradientové eluci se využívá mísení MF z více zásobníků. Mobilní fázi je doporučeno před analýzou filtrovat pomocí vakuové filtrace. Mezi zásobníkem a čerpadlem MF je přívodní hadička, opatřena na konci fritou, která působí nejen jako závaží, ale zároveň také jako filtr [34].

Jedním z problémů (zejména u RPC) týkající se mobilní fáze je přítomnost bublin plynu, proto je před analýzou nutné tyto vzduchové bubliny eliminovat, nejlépe pomocí degasseru. Bublina v pumpě může v extrémních případech způsobit až zastavení dodávky mobilní fáze na kolonu. U optických detektorů může vzduch rozptylovat světlo a způsobit tak vznik šumu v chromatogramu. K odplynění se využívá in-line vakuový odplynovač tvořený semipermeabilní membránou a vakuovou komorou. Efektivního odplynění může být dosaženo pomocí helia, nicméně kvůli nižší dostupnosti helia je v dnešní době jeho použití nižší. Další často využívanou možností je off-line odplynění v ultrazvukové lázni (sonikace) [39].

K zajištění proudění mobilní fáze skrze HPLC systém je zapotřebí vysokotlakého čerpadla. Tyto pumpy čerpají mobilní fázi buď z jednoho nebo více rezervoárů podle toho, jaký eluční mód je zvolen. U gradientové separace dochází k mísení mobilní fáze v mixéru, který je v případě vysokotlakého gradientu umístěn za

čerpadlem a v případě nízkotlakého gradientu před čerpadlem [34].

Dávkování vzorku na kolonu je prováděno dávkovačem. Lze dávkovat manuálně pomocí stříkačky přímo do dávkovacího ventilu, nicméně v dnešní době je běžnější a zároveň praktičtější díky možnosti absence operátora u analýzy využít automatického dávkování pomocí autosampleru. Dávkovač zajišťuje dodání správného a přesného množství vzorku do mobilní fáze a následně na kolonu. Využívá se šesticestného otočného ventilu, který obsahuje vstup pro vzorek, vstup pro MF z pumpy, výstup pro odpad a vstup na kolonu. Tvoří smyčku, která má dvě polohy – naplnit, vstříknout [34].

Místo, kde se odehrává samotná separace, se nazývá kolona. Jde nejčastěji o ocelovou trubici, která je naplněna stacionární fází. Vlastnosti kolony jsou dány typem stacionární fáze (monolitické, porézní, neporézní), geometrií (objem a průměr pórů, velikost a tvar částic) a složením nosiče stacionární fáze (oxid křemičitý, polymery, uhlík) [40].

S kolonou je propojen detektor. Ideální detektor by měl být citlivý, selektivní a stabilní, měl by mít předvídatelnou odpověď, neměl by být ovlivňován teplotou, měl by mít lineárně se zvyšující odezvu s množstvím rozpuštěné látky, měl by být nedestruktivní vůči analyzované látce a měl by zajistit kvalitativní informace o detekovaném píku [41]. Mezi běžné detektory řadíme spektrofotometrický (pro látky s chromofory), fluorimetrický (pro analyty vykazující fluorescenci), refraktometrický a elektrochemický detektor [42].

V dnešní době je hojně využíváno spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (LC-MS). Technika LC-MS kombinuje separační schopnost kapalinové chromatografie a schopnost vysoce kvalitní detekce pomocí hmotnostního spektrometru. Díky vysoké citlivosti a selektivitě je možné detekovat a potvrzovat identitu molekuly [34].

## **1.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)**

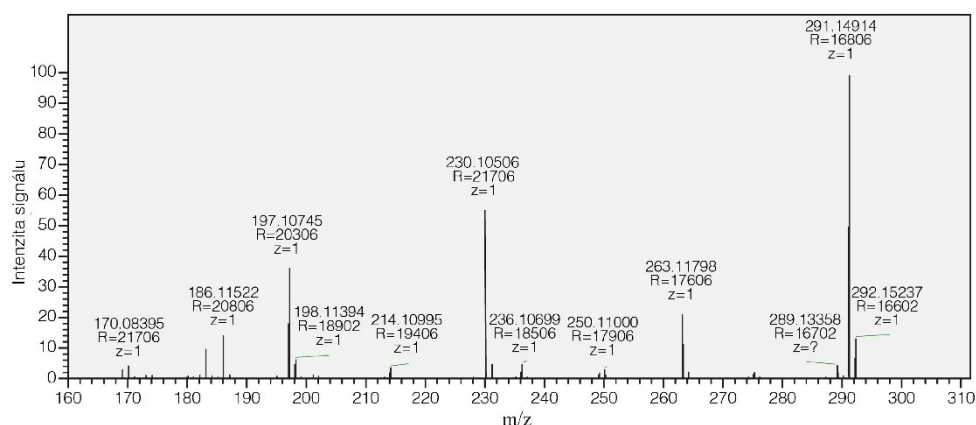
### **1.4.1 Základní charakteristika MS**

Hmotnostní spektrometrie (MS – mass spectrometry) je analytická technika používaná zejména k identifikaci a charakterizaci analytů přítomných ve vzorku. Vešla do popředí díky své citlivosti, vysokému rozlišení, rychlosti skenování a využitelnosti

v rozmanitých aplikacích. Pomocí MS je možné detekovat i izotopické zastoupení prvků v molekule analytu. Uplatnění našla při výzkumu metabolismu léčiv, v proteomice a při analýze nových léčiv. Rutinní uplatnění našla rovněž ve forenzní chemii, v potravinářství, v kontrole čistoty ovzduší apod. [43].

Principem MS je generovat ionty z organických nebo anorganických sloučenin a na základě jejich poměru  $m/z$ , kde  $m$  odpovídá hmotnosti a  $z$  elementárnímu náboji iontu, ionty rozdělovat a následně tyto nabitě molekuly detekovat [44]. Jedná se o destruktivní metodu.

Výsledný záznam z MS analýzy se nazývá hmotnostní spektrum. Příklad hmotnostního spektra 7-fenoxytakrinu je uveden na Obr. 9. Jde o PRM (Parallel Reaction Monitoring) záznam. Na ose x je poměr hmotnosti a náboje  $m/z$  a na ose y je znázorněna odezva signálu.



Obr. 9. PRM záznam 7-fenoxytakrinu.

## 1.4.2 Instrumentace MS

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních částí – iontového zdroje, analyzátoru a detektoru. Dávkování vzorku může být přímé, pomocí injekční stříkačky, nebo lze realizovat pomocí chromatografické soustavy (GC – gass chromatography nebo LC – liquid chromatography). Oproti GC je v současnosti kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií metodou preferovanou, zejména pro její univerzálnější využití [43].

Analyzátor a detektor jsou pod vysokým vakuem, aby u vzniklých iontů nedocházelo ke kolizi s molekulami plynu a aby byla zachována jejich trajektorie [43].

### 1.4.3 Ionizační techniky

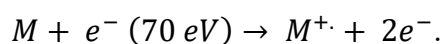
Aby látka mohla být v hmotnostní spektrometrii detekována, musí nést náboj (být ionizována). Ionizace probíhá v iontovém zdroji. V současnosti jsou pro MS dostupné měkké a tvrdé techniky (viz Tab. 2). Při tvrdé ionizaci dochází většinou k několikanásobnému štěpení molekuly analytu, zatímco měkká ionizační technika je z pohledu fragmentace mnohem šetrnější [45]. Další možností ionizace je pomocí ambientní ionizační techniky, která umožňuje přímou ionizaci surového vzorku bez předcházející úpravy za atmosférického tlaku [46]. Výjimku tvoří MALDI (Maticí asistovaná laserová desorpce/ionizace) technika, kde ke vzorku je nutné dodat matici.

Tab. 2 Přehled ionizačních technik.

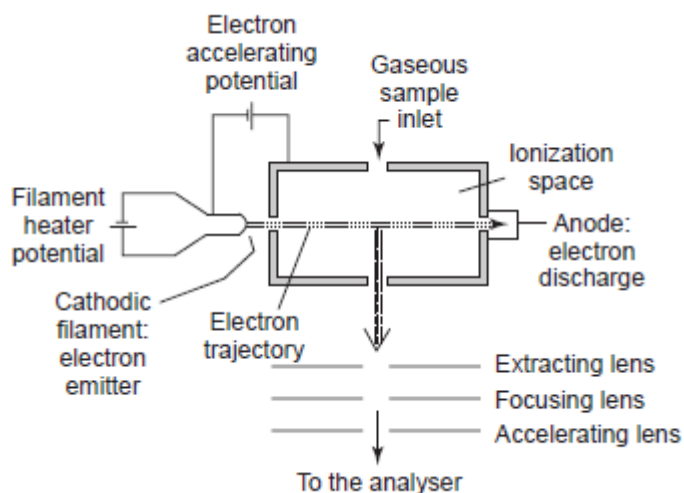
Tvrdá ionizační technika	Měkké ionizační techniky	Ambientní ionizační techniky
Elektronová ionizace	Ionizace elektrosprejem	Direct analysis in real time (DART)
	Chemická ionizace za atmosférického tlaku	Desorption electrospray ionization (DESI)
	Fotoionizace za atmosférického tlaku	MALDI
	Chemická ionizace	

#### Elektronová ionizace (EI):

Základní komponentou iontového zdroje pro tento typ ionizace je vyhřívané vlákno emitující elektrony, které jsou urychlovány směrem k anodě (viz Obr. 10). V ionizační komůrce se elektrony o energiích 70 eV srážejí s plynnými molekulami vzorku, což vede k uvolnění elektronu z molekuly vzorku a ke vzniku kladně nabitého iontu:



Při využití elektronové ionizace je přítomna většinou rozsáhlá fragmentace analyzované látky, v některých případech může vyústit i ve stoprocentní fragmentaci molekulárního iontu [45].



Obr. 10. Zdroj elektronové ionizace (převzato z [45], str. 16).

### Chemická ionizace:

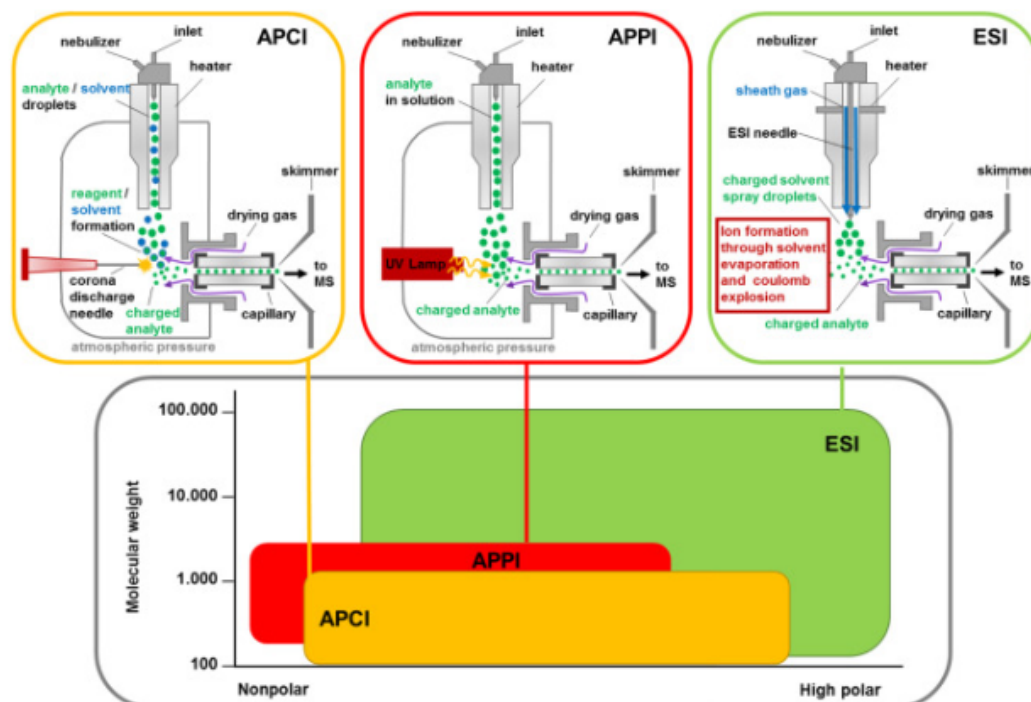
Chemická ionizace (CI) je založena na ion-molekulární reakci, kdy dochází k přenosu elektronu, protonu nebo iontu mezi reaktanty. Za reaktant považujeme neutrální molekulu nebo ionty, které vznikly z reakčního plynu (methan, isobutan, vodík, diethylether, ...) Iontový zdroj je obdobný jako u EI, ale je zde nutná schopnost udržet tlak reakčního plynu. Dále je nutná větší energie elektronů (200 eV) a stabilní teplota. Do reakční komůrky je přiváděn reakční plyn, který je vybírán na základě protonové afinity. Aby došlo k ionizaci, musí dojít k dostatečnému množství srážek reaktantů, což je zajištěno zvýšeným tlakem reakčního plynu na  $2,5 \times 10^2$  Pa [45].

U CI probíhá z důvodu nižší vnitřní energie k menší fragmentaci než u EI. Vznikají spektra s menší nebo žádnou fragmentací, ve kterých je většinou možné molekulární iont nalézt. Často bývá technikou doplňující elektronovou ionizaci a využití nalézá zejména u GC-MS [45].

### Ionizace za atmosférického tlaku (API):

API (Atmospheric pressure ionization) je ionizační technika používaná převážně ve spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS). Existují tři základní typy ionizace za atmosférického tlaku – ionizace elektrosprejem (ESI – Electrospray Ionization), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI – Atmospheric Pressure Photoionization Ionization) [47]. Přehled využití ionizačních technik za atmosférického tlaku v závislosti na fyzikálně chemických

vlastnostech analytu je znázorněn na Obr. 11.

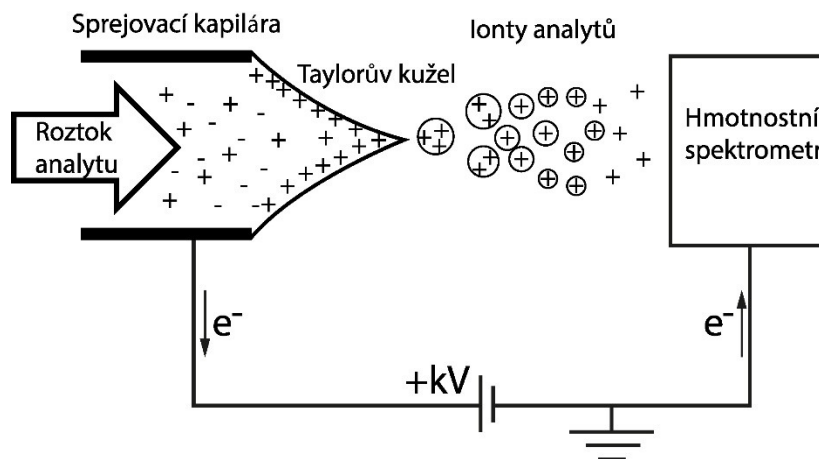


Obr. 11. Přehled využití API v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu včetně schématického zobrazení jednotlivých iontových zdrojů (převzato z [48]).

### Ionizace elektrosprejem (ESI):

Pro elektrosprej ionizační techniku je nejdříve nutný převod analytu z kapalné do plynné fáze. Roztok analytu je přiváděn kovovou kapilárou, která má elektrický potenciál několik kV. Na výstupu z kapiláry vznikají pomocí zmlžujícího plynu (nejčastěji dusíku) nabitě nanokapky. Tyto nanokapky jsou díky sušícímu plynu (horký proud dusíku) zmenšeny odpařením zbytku mobilní fáze (rozpuštědla). Zároveň dochází k zakoncentrování náboje na povrchu nanokapky a při dosažení kritické hodnoty dochází ke coulombické explozi. Vznikají nabitě částice, které jsou usměřovány za pomoci iontové optiky do hmotnostního analyzátoru (viz Obr. 12). Ionizace probíhá za atmosférického tlaku. Jedná se o měkkou ionizační techniku, dochází tak k minimální nebo žádné fragmentaci [49].





Obr. 12. Schématické zobrazení elektrospreje (převzato a upraveno dle [49]).

### **Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI):**

Při volbě této techniky dochází k ionizaci pomocí koronového výboje, který vzniká na výbojové elektrodě. Nejdříve jsou ionizovány molekuly mobilní fáze, následně náboj skrze ion-molekulární interakci přechází na analyt. Tato technika je vhodná pro látky středně polární až polární [50].

### **Fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI):**

Tato velmi citlivá metoda ionizace je vhodná zejména pro málo polární až nepolární látky. Zdrojem ionizace je zde UV-lampa, která po přívodu odpařené směsi analytu a mobilní fáze ionizuje pomocí fotonů molekuly vzorku [51]. Jedná se tedy o obdobu APCI, hlavním rozdílem je použití výbojky emitující fotony místo koronového výboje [45].

### **Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI):**

Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace, zkráceně MALDI (z angl. Matrix-Associated Laser Desorption/Ionization), je ionizační technika, ve které matrice absorbuje energii z laseru a vytváří iont z velké molekuly s minimální fragmentací. Je to oblíbená technika využívaná v klinických biologických laboratořích. Nejčastěji najdeme tuto ionizační techniku ve spojení s TOF (Time of Flight) detektorem. Tato metoda nám umožňuje rychlou, přesnou a citlivou identifikaci biomolekul (např. DNA a peptidů). Výhodou techniky MALDI-TOF je, že vzorek nevyžaduje náročnou úpravu před analýzou a samotná analýza je velmi rychlá a efektivní [52].

### **Desorpční elektrosprej (DESI):**

DESI z angl. Desorption Electrospray Ionization je ambientní ionizační technika,

tzn. že analyt je ionizován vně hmotnostního spektrometru. ESI generuje nabité kapičky, které dopadají na povrch nesoucí analyt a následně desorbují ionty analytu. Tyto vzniklé mikrokapky jsou nasávány do vstupu hmotnostního spektrometru, kde jsou zanalyzovány. Výhodou je, že tato technika vyžaduje minimální nebo žádnou úpravu vzorku. Nevýhodou je však složitost spekter, proto se pro ionizaci velkých molekul tato ionizační technika v praxi většinou nevolí [53].

#### **Přímá analýza v reálném čase (DART):**

Direct Analysis in Real Time (DART) je další z ambientních ionizačních technik. V prvním kroku se v iontovém zdroji vytváří vysokorychlostní proud zahřátých iontů plynu (nejčastěji hélia). Dále následuje interakce metastabilních vysoce zahřátých molekul hélia s molekulami vzorku a vzduchu, což vede k tepelné desorpci molekul ze vzorku za vzniku iontů. Tato technika se vyznačuje nízkým detekčním limitem a minimálním požadavkem na úpravu vzorku [54].

### **1.4.4 Hmotnostní analyzátory**

Ionty nesoucí náboj jsou za pomoci iontové optiky posouvány do analyzátoru, kde jsou na základě jejich poměru hmotnosti a náboje separovány. Separace je založena buď na elektrickém, nebo magnetickém poli, anebo na kombinaci těchto dvou [45].

Žádoucí vlastnosti analyzátoru jsou:

1. Široký hmotnostní rozsah  $m/z$ , ve kterém může analyzátor měřit.
2. Přesnost – vyjádřená v ppm (parts per million – určení rozdílu mezi naměřenou a teoretickou hmotou).
3. Správnost určení hodnoty  $m/z$
4. Rozlišovací schopnost – poskytnutí odlišných signálů pro dva ionty s podobným poměrem  $m/z$ .
5. Rychlost analýzy (skenování) – vyjadřuje se v hmotnostních jednotkách za sekundu  $s^{-1}$ .
6. Lineární dynamický rozsah [43].

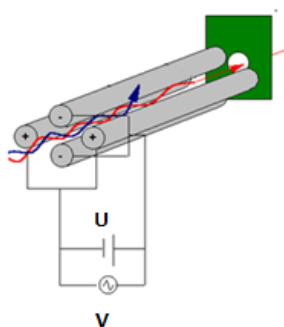
#### **Analyzátor doby letu:**

Anglický ekvivalent pro analyzátor doby letu je TOF – Time of Flight. Analyzátor je tvořen letovou trubicí o známé délce, ve které se pohybují ionty rychlostí, která je daná jejich poměrem hmotnosti a náboje  $m/z$  a na základě této rychlosti jsou

separovány. Částice s nižším poměrem  $m/z$  doletí na konec letové trubice dříve než částice s vyšší hodnotou  $m/z$ . V případě tohoto analyzátoru je teoreticky možné separovat ionty bez omezení teoretické horní hranice poměru  $m/z$ . Nejčastěji nachází uplatnění v kombinaci s iontovým zdrojem MALDI. Tato kombinace je označována zkratkou MALDI-TOF [55].

### **Kvadrupól:**

Kvadrupól je analyzátor tvořený čtyřmi paralelními tyčemi. Dvojice protilehlých tyčí jsou připojeny ke zdroji stejnosměrného napětí o velikosti  $U$ , současně je na tyče přivedeno střídavé napětí o velikosti  $V$ . Schéma zapojení kvadrupólu je zobrazeno na Obr. 13. Napětí na tyčích generuje časově proměnlivé elektrické pole. Nabitá částice se v takovémto poli pohybuje s určitou oscilací (poměr napětí ovlivňuje stabilitu trajektorie). Ionty se stabilní oscilací prochází kvadrupólem bez dotyku tyčí směrem k detektoru. Pokud by došlo k dotyku, byl by iont vybit a nebylo by ho možné následně detekovat. Vhodnou volbou  $U$  a  $V$  napětí dochází k postupnému procházení jednotlivých iontů s hodnotou  $m/z$  [43].



Obr. 13. Schéma zapojení kvadrupólu upraveno dle [56].

Kvadrupólový analyzátor je rovněž vhodný pro tandemovou MS/MS analýzu, kdy jsou za sebou zapojené tři kvadrupóly a mluvíme o tzv. trojitém kvadrupólu.

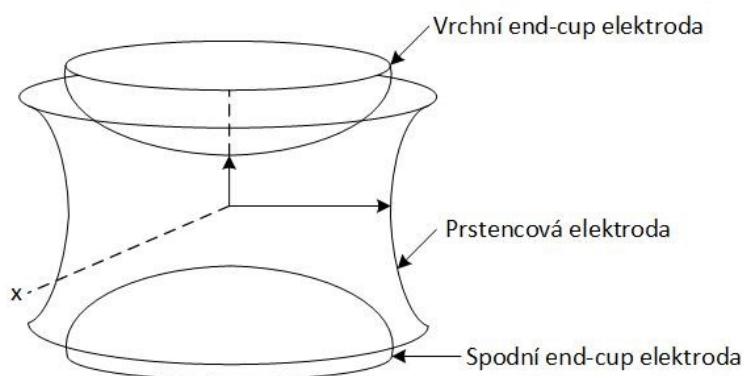
Mezi nevýhody kvadrupólu patří nižší rozlišení a omezený hmotnostní rozsah [43], [45].

### **Iontové pasti:**

Analyzátorů typu iontových pastí využívají elektrického pole k záchytu iontů. Klasifikujeme dva základní typy pastí – 2D (LIT – linear ion trap) a 3D (QIT – quadrupole ion trap) iontové pasti [43].

Sférická kvadrupólová iontová past zachycuje ionty do tzv. pastí a následně je

propouští směrem k detektoru v pořadí vzestupného poměru  $m/z$ . Past je tvořena třemi elektrodami netypického tvaru – první dvě elektrody jsou téměř identické, připomínající obrácený talíř (tzv. end-cap elektrody), s rozdílným počtem otvorů. První elektroda má pouze jeden centrální otvor, kudy prochází ionty, druhá elektroda má těchto centrálně uspořádaných otvorů pro průnik iontů do detektoru více. Třetí elektroda je prstencového tvaru a je umístěna mezi end-cap elektrodami [57]. Uspořádání elektrod je znázorněno na Obr. 14.



Obr. 14. Uspořádání elektrod v kvadrupólové iontové pasti (převzato a upraveno dle [57]).

Lineární iontová past (2D) je založena na čtyřtyčovém uspořádání kvadrupólu zakončeným čočkami. Celý analyzátor je rozdělen do tří segmentů – dva segmenty (krajové) jsou tvořeny koncovými elektrodami, na které je vkládáno stejnosměrné napětí, čímž jsou ionty odpuzovány směrem do středu pasti. Ionty zachycené uvnitř LIT mohou být vypuzeny selektivně na základě hmotnosti, a to buď podél osy pasti (axiálně), nebo kolmo na tuto osu (radiálně). V případě axiálního výběru je mezi tyče lineární pasti a čočku přivedeno střídavé napětí. U radiální selekce iontů jsou u protilehlých tyčí otevřeny sloty a na tyto tyče je přivedeno vhodné napětí. Výhodou LIT oproti 3D pasti je její vyšší kapacita záchytu iontů, zároveň nižší náchylnost ke vzniku prostorového náboje [59].

### **Orbitální past:**

Mezi novější analyzátoři je možné zařadit orbitální pasti. Jde o typ elektrostatické pasti, kdy jsou ionty zachycovány v elektrickém poli. Vyznačuje se vysokým rozlišením a senzitivitou – tyto vlastnosti jsou esenciální pro nespočet oblastí, a to nejen v rutinní analýze, ale rovněž v proteomice. Základní myšlenkou pro vynález orbitální pasti, byla snaha vytvořit analyzátor, který nemá nedostatky analyzátorů objevených dříve. Příklady nedostatků jsou – složitost a velikost analyzátorů iontové

cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací, historicky nízká citlivost a rozsah analyzátoru doby letu (TOF), a také omezená přesnost iontové pasti [60].

Orbitální past je tvořena třemi elektrodami. Dvě vnější elektrody, které jsou odděleny dielektrickým centrálním kroužkem, slouží pro vytvoření pole zachycující ionty a jako přijímající desky pro detekci axiální oscilace. Centrální elektroda vřetenovitého tvaru drží past pohromadě. Elektrické pole mezi vnější a centrální elektrodou a odstředivá síla umožňují iontům udržet si axiální oscilace. Tyto oscilační frekvence (stabilní trajektorie iontu tvořena rotačním pohybem kolem centrální elektrody, radiálním pohybem o určité frekvenci a axiální oscilací podél elektrody o dané frekvenci) jsou detekovány vnějšími elektrodami ve formě časového průběhu proudu. Signál je dále zpracován Fourierovou transformací a následně převeden do hmotnostního spektra [61]. Dle [62] je frekvence těchto oscilací opačně úměrná poměru  $m/z$  iontů. Tato frekvence závisí pouze na hmotnosti a geometrické konstantě.

#### **Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací:**

Iontový cyklotronová rezonance je nejčastěji uváděna pod zkratkou FT-ICR (Fourier Transform Cyclotron Ion Resonance). V těchto analyzátoch sledujeme zakřivení dráhy iontu v magnetickém poli, které je produkované supravodivým magnetem. Pokud je rychlost iontu nízká a pokud je magnetické pole dostatečně intenzivní, pak je iont zachycen do kruhové cirkulace magnetického pole [45]. Každá nabitá částice vykazuje specifickou cyklotronovou frekvenci. Stanovení hmotnosti v tomto případě spočívá v určení frekvence:

$$\omega_c = \frac{qB}{m},$$

kde  $q$  představuje náboj iontu a  $B$  indukci magnetického pole. Po změření frekvence je tedy možné pomocí Fourierovy transformace převést signál do hmotnostního spektra [63].

Nicméně poloměr dráhy iontu po vstupu do cyklotronu je nedetekovatelný, proto musí být iont ozařován elektromagnetickou vlnou, která má stejnou frekvenci jako iont v cyklotronu (rezonance – dojde ke shodě kmitočtů). To vede k nárůstu kinetické energie (k excitaci orbitu), což způsobí zvětšení poloměru dráhy [45].

FT-ICR je nejselektivnější MS technika s rozlišením více jak 1 000 000, což je ideální pro stanovení elementárního složení a k identifikaci sloučeniny. Avšak kvůli nutnosti přítomnosti magnetu je zapotřebí tekuté helium a dusík, což je pro provoz

nákladné. Rovněž prostorové nároky pro tento typ analyzátoru jsou v porovnání s ostatními poměrně značné [59].

### 1.4.5 Hmotnostní detektory

Nejběžnějším typem detektoru je Faradayův pohár nebo elektronový multiplikátor.

#### **Faradayův pohár:**

Faradayův pohár je tvořen kovovým válcem s malým otvorem, do kterého postupně pronikají ionty, které jsou následně neutralizovány přijmutím nebo odevzdáním elektronu při kontaktu se stěnou klece, která je tvořena sekundárně emitujícím materiálem. Po dopadu iontu jsou tedy emitovány elektrony indukující proud, který je následně zesílen a detekován [43].

#### **Elektronový multiplikátor (násobič):**

Když nabitá částice, která zasáhne povrch elektronového násobiče, uvolní z povrchové vrstvy atomu sekundární elektron. Počet uvolněných elektronů závisí na typu dopadající primární částice a na její energii.

Dynoda je vakuová elektroda, která emituje elektrony po nárazu iontu nebo elektrony s dostatečnou kinetickou energií. Elektronový multiplikátor spojuje řadu takovýchto dynod, díky čemuž sekundární emise probíhá opakovaně a exponenciálně se tak zesiluje počet elektronů.

Existují dva typy multiplikátorů elektronů používaných v hmotnostní spektrometrii – multiplikátor elektronů s diskrétní dynodou a multiplikátor elektronů s kontinuální dynodou [64].

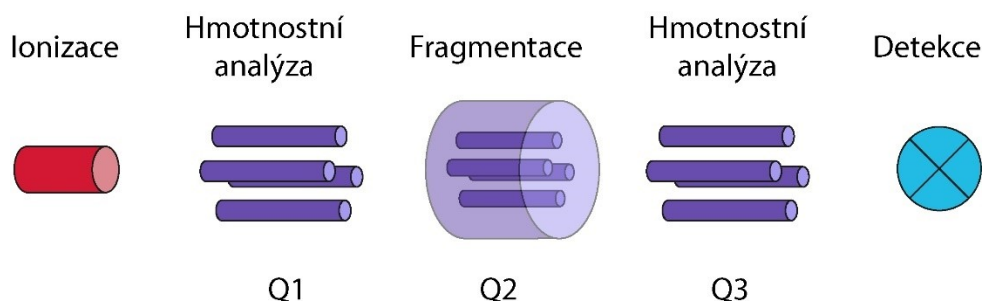
### 1.4.6 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová MS, taktéž nazývaná MS/MS technika slouží k fragmentaci vybraných prekurzorových iontů na produktové ionty (fragmenty). Díky takto vznikajícím fragmentům je pak následně možné částečně, či úplně objasnit chemické struktury analyzovaných látek.

Tandemová MS zahrnuje tři odlišné kroky: selekce – fragmentace – detekce. Tyto tři kroky lze realizovat v prostoru nebo v čase.

Typický tandem v prostoru je trojitý kvadrupól (QQQ – Triple Quadrupole), kde

jsou tři kvadrupóly seřazeny za sebou (viz Obr. 15). Prekurzorový iont je vybrán v Q1, následně v Q2 pomocí kolizního plynu fragmentován a dále jsou ionty analyzovány v Q3 [65].



Obr. 15. Schéma trojitého kvadrupólu (převzato a upraveno dle [66]).

Iontová past nebo FT-ICR jsou příkladem tandemové MS v čase. V iontové pasti je ponechán pouze vybraný iont (ostatní jsou z pasti odstraněny), který je následně fragmentován. Po této fragmentaci dojde k detekci produktů reakce.

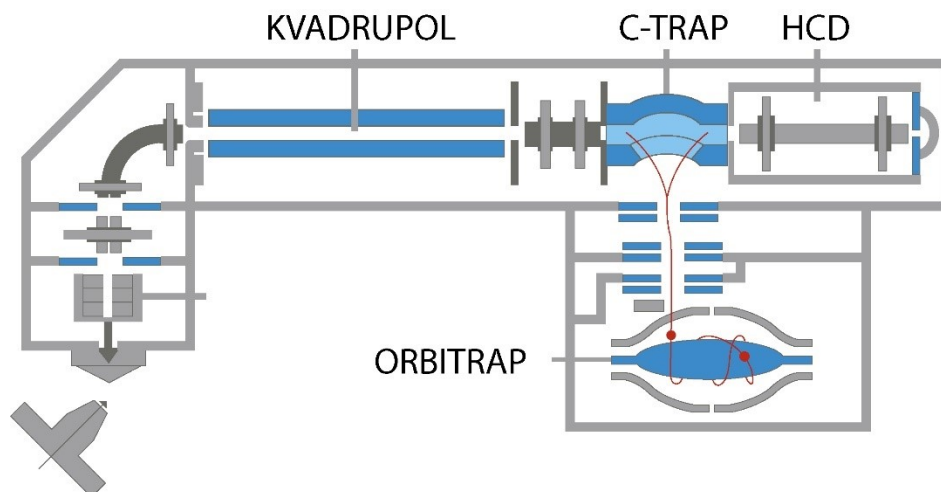
Mezi výhody tandemové MS-MS patří citlivost a rychlost skenu [43].

#### **Možnosti tandemové MS-MS analýzy u orbitrapu:**

Jednou z možností MS-MS analýzy je spojení kvadrupólu s orbitrapem. Orbitrap poskytuje prostředí, kde dochází k zachycování iontů a k měření s vysokým rozlišením, avšak za cenu delší doby měření. Kvadrupól zde slouží jako širokopásmový hmotnostní filtr, který izoluje konkrétní hmotnostní rozsah.

K dopravení iontů do orbitrapu se využívá zařízení C-trap. C-trap je vysokofrekvenční zařízení, které nejen shromažďuje ionty a tvoří iontový mrak, ale je také schopné ho urychlit skrze malý otvor ve vnější elektrodě orbitrapu až k centrální elektrodě. Aby ionty po vstřiku do orbitrapu byly zachyceny, je zapotřebí, aby se napětí centrální elektrody orbitrapu na krátkou dobu prudce zvýšilo. C-trap je důležitá pomocná část Q-Orbitrapu, avšak je zodpovědná za řadu omezení. Jedním z omezení je iontová kapacita. Je nezbytné, aby nedošlo k přeplnění C-trapu ani orbitrapu, protože by mohlo dojít ke ztrátě některých iontů.

Spojení kvadrupólu s orbitrapem poskytuje fragmentaci iontů na fragmenty. Fragmentace molekul probíhá v HCD (Higher Collision Dissociation) buňce zbytkovým plynným dusíkem (viz Obr. 16) [67].



Obr. 16 Schéma Q-Orbitrapu (převzato z [68]).

Tohoto spojení se hojně využívá v proteomice, metabolomice, analýze reziduí a v analýze potravin a životního prostředí. Q-Orbitrap má podobné vlastnosti jako QQQ, ale poskytuje vyšší hmotnostní rozlišovací schopnost [67].



## 2 CÍL PRÁCE

Předmětem této práce byla *in vitro* biotransformační studie 7-fenoxytakrinu.

Tato studie měla hlavní a dílčí cíle mezi než patří:

- Provést metabolické experimenty.
- Vyhodnotit získaná spektra.
- Z fragmentačních spekter navrhnout strukturu fragmentů parentní látky.
- Za pomoci struktur fragmentů navrhnout strukturu metabolitů.
- Stanovit nárůst jednotlivých metabolitů v čase.
- Stanovit úbytek parentní látky v čase.
- Stanovit  $t_{1/2}$  a intrinsic clearance 7-fenoxytakrinu.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Biologický materiál

Jako zdroj biotransformačních enzymů I. fáze byly k provedení experimentu použity lidské jaterní mikrosomy od výrobce Sekisei XenoTech s katalogovým číslem a šarží H0620/LOT no. 1410230. Mikrosomy této šarže jsou složeny z enzymů cytochromů P450, cytochromu  $b_5$  a NADPH-cytochrom c reductázy. Mikrosomy byly získány frakcionací z jater 50 osob různého pohlaví a různého etnického původu. Uchovávaly se v tekutém dusíku při  $-196$  °C. Před samotným zahájením experimentů byly rozaliquotovány do Eppendorf mikrozkušavek o objemu 1,5 ml po 25  $\mu$ l (případně po 15  $\mu$ l). Pro další experimenty byly uloženy do hlubokomrazicího boxu o teplotě  $-80$  °C a v případě potřeby se příslušné množství nechávalo rozmrazit na laboratorním stole při laboratorní teplotě.

Roztok RapidStart K5000/LOT no. 1910008 sloužil jako NADPH regenerační systém k aktivaci mikrosomů. Nařazení roztoku bylo provedeno dle instrukcí výrobce [69]. Roztok byl dále rozaliquotován po 50  $\mu$ l (příp. 25  $\mu$ l) do Eppendorf mikrozkušavek. Pro další experimenty byl stejně jako mikrosomy rozaliquotovaný roztok uchováván v hlubokomrazicím boxu a v případě použití, těsně před daným experimentem, volně rozmrazen při laboratorní teplotě.

### 3.2 Chemikálie

Jako rozpouštědlo pro přípravu zásobních roztoků byla použita ultračistá voda stupně kvality typu I dle norem ASTM. Voda je připravována dvoustupňovou reverzní osmózou kombinovanou s ultrafiltrací nebo destilací. K přípravě této ultračisté vody sloužil přístroj Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF. Dalším používaným rozpouštědlem byl dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich, Německo), ve kterém se dobře rozpouštěla analyzovaná látka 7-fenoxytakrin.

Mobilní fáze pro chromatografickou analýzu byla složena z acetonitrilu (ACN) stupně kvality pro LC/MS analýzu a ultračisté vody. Dále byla do mobilní fáze jako aditivum přidávána 0,1% (v/v) kyselina mravenčí k podpoře ionizace látky.

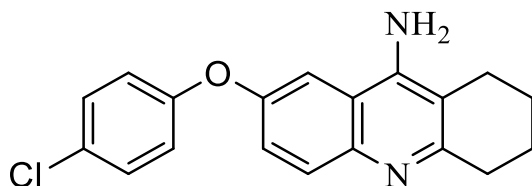
Během vypracovávání této diplomové práce byl rovněž použit hydroxid draselný (KOH) a dihydrogenfosforečnan draselný (oba Sigma Aldrich, Německo).

### 3.3 Pracovní a zásobní roztoky

Roztok 0,1M dihydrogenfosforečnanového pufru ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) byl připraven rozpuštěním 0,68045 g čistého  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 50 ml ultračisté vody s následnou úpravou pH na hodnotu 7,4 pomocí přidavku 5M roztoku hydroxidu sodného KOH.

Příprava zásobního roztoku stanovované látky spočívala v navážení daného množství 7-fenoxytakrinu podle potřebné koncentrace, její rozpuštění v 0,5 ml DMSO a doplnění ultračistou vodou do 1 ml. V rámci experimentů této diplomové práce se pracovalo se čtyřmi koncentracemi zásobních roztoků – 3  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$  a 90  $\mu\text{M}$ .

Roztok vnitřního standardu (IS) byl připraven v 50% dimethylsulfoxidu. Jako vhodný vnitřní standard byl pro mikrosomálně stabilitní studii zvolen 7-(4-chlorfenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin (Obr. 17) zejména kvůli strukturní podobnosti a vyšší lipofilitě v porovnání s molekulou 7-fenoxytakrinu. IS se přidával do ACN, který sloužil pro zastavení metabolické reakce po kultivaci zkoušené látky s mikrosomy. Roztok ACN s IS byl ochlazován v  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .



Obr. 17 Struktura vnitřního standardu 7-(4-chlorfenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-aminu.

### 3.4 Technické vybavení

Aby mohl být experiment realizován, bylo zapotřebí několika laboratorních přístrojů. Kromě přístrojů bylo zapotřebí laboratorního skla, vialek s víčky, mikrozkušavek a špiček Eppendorf®. Dále bylo používáno ostatní technické zázemí laboratoře.

Vážení vzorků bylo prováděno na analytických vahách Sartorius CPA225D-0CE (Sartorius AG, Německo). K odměření objemů rozpouštědel byly používány pipety Eppendorf Reference® (0,5 – 10  $\mu\text{l}$ , 10 – 100  $\mu\text{l}$ , 100 – 1000  $\mu\text{l}$ , 0,5 – 5 ml). Pro získání homogenního vzorku a usnadnění rozpouštění byla používána třepačka Labdancer IKA (IKA, Německo). Popřípadě byly vzorky promíchány na malé třepačce Vortex Mixer třepačka Wizard (P-LAB a.s., CZ). Pomocí pH metru Hanna EDGE® (Hanna Instruments, Itálie) bylo měřeno pH při přípravě fosfátového pufru. Vzorky byly třepány

na třepače s inkubátorem Eppendorf ThermoMixer C (Sigma Aldrich, Německo). Aby mohl být odebrán supernatant pro samotnou analýzu, bylo nutné vzorky centrifugovat za využití centrifugy Universal 320 R (Hettich Zentrifugen, Německo). Pro zakoncentrování vzorku pro identifikační studii byl vzorek odpařen na koncentračním vakuovým rotátoru (Labconco Corporation, Kansas City, MO, USA).

Ultrazvuková lázeň Elma S 40 (P-LAB a.s., CZ) sloužila k odplynění HPLC mobilních fází. Samotná analýza probíhala na kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem.

### **Kapalinová chromatografie:**

Analýza vzorků probíhala na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3000 RS od firmy ThermoFisher, Německo (Tab. 3).

Tab. 3 Instrumentální složení kapalinového chromatografu.

Čerpadlo	Binární vysokotlaké HPG-30400RS
Vakuový odplynovač	
Kolony	Kinetex C18, 150 × 3 mm, 2,6 μm, 100 Å (Phenomenex)
	Kinetex C18 EVO, 50 × 2,1 mm, 1,7 μm, 100 Å (Phenomenex)
Kolonový termostat	TCC-3000
Automatický dávkovač	WTS-3000 (nástríková smyčka o objemu 25 μl)
Detektor	Q-Orbitrap
Program	Chromeleon 6.80

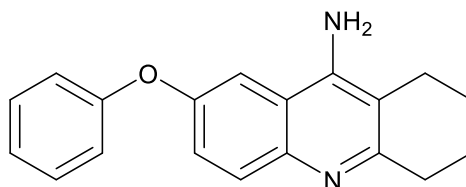
### **Hmotnostní spektrometr:**

Detekce metabolizované látky po HPLC separaci probíhala v hmotnostním spektrometru Q Exactive Plus od firmy ThermoFisher Scientific. HESI (heated electrospray ionization) sloužil jako iontový zdroj. Jako hmotnostní analyzátor byl použit hybridní kvadrupol-orbitrap. Pro vyhodnocování dat byl používán software Xcalibur 3.0.63.

MassFrontier 7.0 byl využíván k predikci fragmentů a program ChemDraw Professional 15.1, který sloužil k modelaci molekul. Dále byl používán program Microsoft Excel.

### 3.5 Popis zkoumané látky

7-fenoxytakrin (7-FEOTA) je nažloutlá krystalická látka se systematickým názvem 7-fenoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin. Struktura 7-fenoxytakrinu je zobrazena na Obr. 18.



Sumární vzorec: C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O

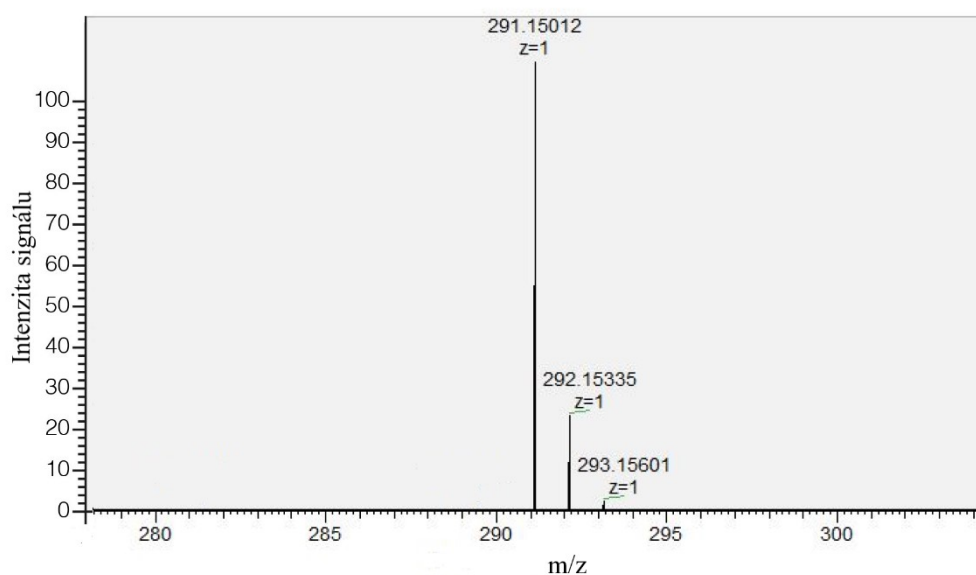
Mol. hmotnost: 290,36600

Elementární složení: C 78,59; H 6,25; N 9,65; O 5,51

[M + H]<sup>+</sup>: 291,14919

Obr. 18 Struktura 7-fenoxytakrinu.

Vygenerovaný poměr hmotnosti a náboje v programu ChemDraw jednonásobně nabitě molekuly je  $m/z = 291,14919$ . Námi experimentálně stanovená hodnota je  $m/z = 291,15012$  (3 ppm) (viz Obr. 19). Na Obr. 19 je uvedena experimentálně naměřená izotopická obálka molekuly 7-fenoxytakrinu, která 7-FEOTU charakterizuje. Experimentálně naměřené izotopické zastoupení prvků je 291,15012 (100 %), 292,15335 (24 %) a 293,15601 (2 %). Izotopické zastoupení prvků vygenerované v programu ChemDraw je 291,14919 (100,0 %), 292,15254 (20,5 %), 293,15590 (2,0 %).



Obr. 19 Experimentálně stanovená izotopická obálka 7-FEOTY.

### 3.6 Metodika experimentu

Pracovní postup pro metabolickou studii látky 7-fenoxytakrin vychází z metabolické studie Nepovímová *et al* [70] a ze stabilitního protokolu výroby mikrosomů Cyprotex [71]. V průběhu vypracování této diplomové práce byly podmínky experimentů dle postupně získávaných výsledků upravovány. Jednalo se zejména o koncentrace zásobních roztoků, časy inkubace a parametry LC-MS metod. Přehled jednotlivých experimentů je uveden v Tab. 4.

Tab. 4 Přehled jednotlivých experimentů prováděných v rámci diplomové práce.

	1. experiment	2. experiment	3. experiment	4. experiment
Typ studie	Identifikace	Identifikace Kvantifikace	Kvantifikace odezvy metabolitů	Kvantifikace úbytku parentní látky
Inkubační časy	24 h	15/30/45/60/90/120 /150 min	5/10/15/30/45/60/ 90/120 min	0/5/15/30/45/60 min
Koncentrace zásobního roztoku	30/60/90 $\mu\text{M}$	30/60/90 $\mu\text{M}$	90 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$
Délka metody	30 min	50 min (ident.)/10 min(kvantif.)	5,5 min	7,5 min

### 3.6.1 Identifikační a kvantifikační experimenty

#### Příprava vzorků:

Při přípravě vzorků pro první, druhý a třetí experiment se k předem rozpipetovaným a rozmraženým 25  $\mu\text{l}$  HLM přidalo 50  $\mu\text{l}$  RapidStartu a 420  $\mu\text{l}$  0,1M fosfátového pufru (pH = 7,4). Směs se nechala při laboratorní teplotě (tj. cca 20 – 23  $^{\circ}\text{C}$ ) 5 minut na třepačce inkubovat při malých otáčkách (300 RPM). Do takto připravené směsi se ze zásobního roztoku napipetovalo 5  $\mu\text{l}$  vzorku o potřebné koncentraci.

Výsledné roztoky o objemu 500  $\mu\text{l}$  se nechaly inkubovat požadovaný čas, viz Tab. 4. Inkubace probíhala v třepačce vytemperované na 37  $^{\circ}\text{C}$  při otáčkách 400 RPM. Po uplynutí inkubace byla reakce zastavena přidáním 500  $\mu\text{l}$  na  $-20^{\circ}\text{C}$  vychlazeného ACN. Po centrifugaci vzorků (12 000 RPM, 5 min) bylo odebráno z každé mikrozkušavky 800  $\mu\text{l}$  supernatantu, který byl následně podroben kvantifikační LC-MS/MS analýze. Pro identifikační experiment bylo z důvodu zakoncentrování jednotlivých komponent vzorku 800  $\mu\text{l}$  supernatantu odpařeno dosucha a poté rekonstituován, viz. níže.

#### Rekonstituce vzorků:

K odpařeným vzorkům bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  50 % ACN, což bylo následně zvortexováno a ultrazvukováno po dobu 5 minut. Následně opět zvortexováno, centrifugováno (3000 RPM; 3 min) a odebráno do vialky s kónickým inzertem. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí LC-MS/MS.

#### Kontrolní vzorky:

V neposlední řadě byly pro experimenty 1, 2 a 3 připraveny kontrolní vzorky (K), pomocí kterých byla ověřena funkčnost jak mikrosomů tak i RapidStartu. Podmínky a průběh preinkubačního a inkubačního experimentu byly u kontrolních vzorků shodné jako u vzorků uvedených výše, pouze složení vstupních komponent bylo dle Tab. 5.

Tab. 5 Složení kontrolních vzorků.

<b>K<sub>1</sub></b>	25 $\mu\text{l}$ mikrosomy + 50 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O + 5 $\mu\text{l}$ zásobní roztok
<b>K<sub>2</sub></b>	25 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O + 50 $\mu\text{l}$ RapidStart + 5 $\mu\text{l}$ zásobní roztok
<b>K<sub>3</sub></b>	25 $\mu\text{l}$ mikrosomy + 50 $\mu\text{l}$ RapidStart + 5 $\mu\text{l}$ 5% DMSO

### Kalibrační řada:

Dále byla vytvořena kalibrační řada o 5 koncentračních hladinách 7-fenonxytakrinu – 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 70  $\mu\text{M}$  a 90  $\mu\text{M}$  naředěním potřebného množství zásobního roztoku v 50% ACN.

### 3.6.2 Mikrosomálně stabilitní experiment

Experiment č. 4 byl prováděn zejména jako kvantifikační a mikrosomálně stabilitní studie, a proto se postupovalo mírně pozměněným způsobem než u předchozích experimentů (dle protokolu Cyprotex: [71]). Bylo využito rozalíkvotovaných mikrosomů po 12,5  $\mu\text{l}$  a RapidStartu po 30  $\mu\text{l}$ , se kterými se v průběhu experimentu pracovalo na ledu. Připravilo se 5 vzorků odpovídajících jednotlivým časovým bodům inkubace (0 – 45 minut). Vzorky byly připraveny smísením 12,5  $\mu\text{l}$  mikrosomů s 5  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku fenoxytakrinu o koncentraci 3  $\mu\text{M}$ . Osmý vzorek byl tvořen 12,5  $\mu\text{l}$  mikrosomů a 5  $\mu\text{l}$  50% DMSO a sloužil jako biologická kontrola  $K_6$  (viz Tab. 6). K těmto šesti vzorkům se přidalo 458  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru a směs se nechala preinkubovat 5 minut na třepačce při malých otáčkách (300 RPM). Připravené vzorky se opět uchovávaly na ledu a podle inkubačních intervalů se po přidání 25  $\mu\text{l}$  RapidStartu vkládaly na třepačku. Vzorky se inkubovaly při 37  $^{\circ}\text{C}$ , 400 RPM otáčkách po zvolený inkubační čas (0, 5, 15, 30 a 45 min). Reakce byla zastavena přidáním 500  $\mu\text{l}$  ochlazeného ACN ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) s přídavkem 1  $\mu\text{M}$  IS (7-(4-chlorfenoxy)-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amin) a tato směs byla ihned protřepána. Poté se vzorky centrifugovaly (12 000 RPM, 5 minut). V posledním kroku se odebralo 400  $\mu\text{l}$  supernatantu do vialky s insertem a takto připravené vzorky byly kvantifikovány pomocí HPLC-MS.

Složení kontrolních vzorků použitých v experimentu č. 4 je uvedeno v Tab. 6

Tab. 6 Složení kontrolních vzorků v experimentu č. 4.

<b>K<sub>4</sub></b>	12,5 $\mu\text{l}$ mikrosomů + 5 $\mu\text{l}$ zásobní roztok + 25 $\mu\text{l}$ H <sub>2</sub> O + 458 $\mu\text{l}$ fosfátového pufru
<b>K<sub>5</sub></b>	5 $\mu\text{l}$ zásobního roztoku (3 $\mu\text{M}$ ) + 495 $\mu\text{l}$ fosfátového pufru
<b>K<sub>6</sub></b>	12,5 $\mu\text{l}$ mikrosomů + 5 $\mu\text{l}$ 50% DMSO + 25 $\mu\text{l}$ RapidStartu + 458 $\mu\text{l}$ fosfátového pufru



### 3.7 LC-MS analýza

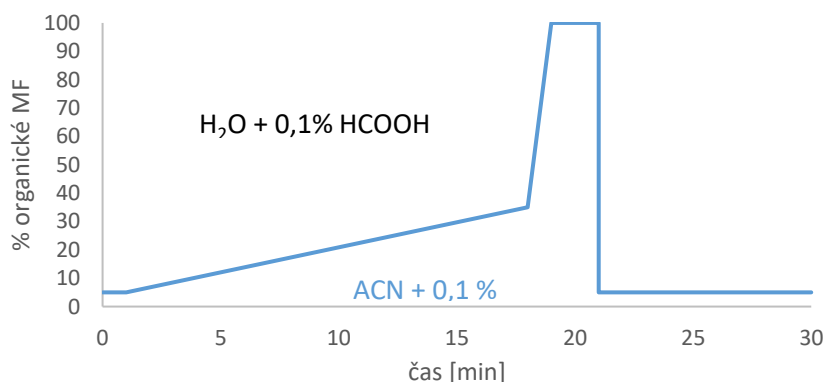
Konkrétní parametry HPLC metody viz Tab. 7.

Tab. 7 Parametry HPLC metody.

<b>Typ eluce</b>	Gradientová
<b>Délka metody</b>	Obměňována (7,5 – 50 min)
<b>Teplota autosampleru</b>	10 °C
<b>Teplota kolonového prostoru</b>	27 °C (40 °C u identifikační studie)
<b>Průtok MF</b>	0,4 ml/min (0,5 ml/min u stabilní studie)

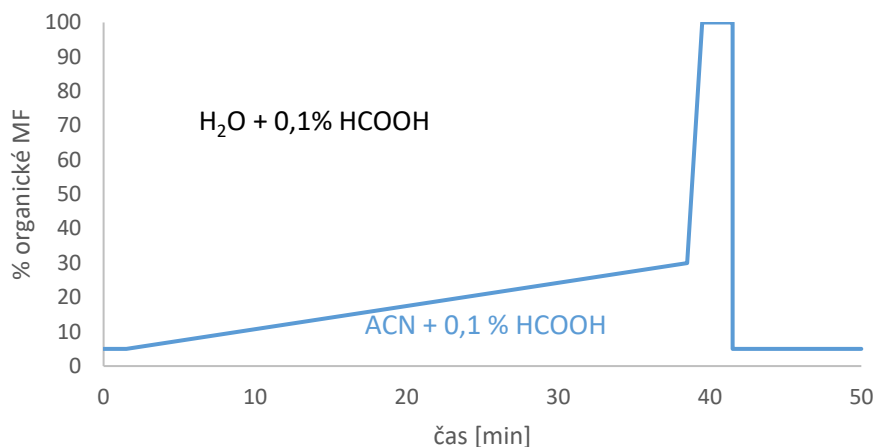
V dalším kroku se připravila mobilní fáze. Pro všechny analýzy byla zvolena gradientová eluce, proto bylo zapotřebí připravit dvě zásobní láhve s mobilními fázemi. Jedna láhev s mobilní fází se připravila smísením ultračisté vody a 0,1% (v/v) kyseliny mravenčí. Druhá zásobní láhev byla naplněna ACN kvality LC-MS s přídatkem 0,1% (v/v) HCOOH. MF byla poté z důvodu odplynění sonifikována 15 minut na ultrazvukové lázni.

Po provedení screeningového experimentu 1 (30minutová metoda; teplota 40 °C; Kinetex C18, 150 × 3 mm; gradient uveden na Obr. 20) bylo nutné lehce optimalizovat podmínky metody, protože při takto zvolených podmínkách nedocházelo k separaci jednotlivých metabolitů.



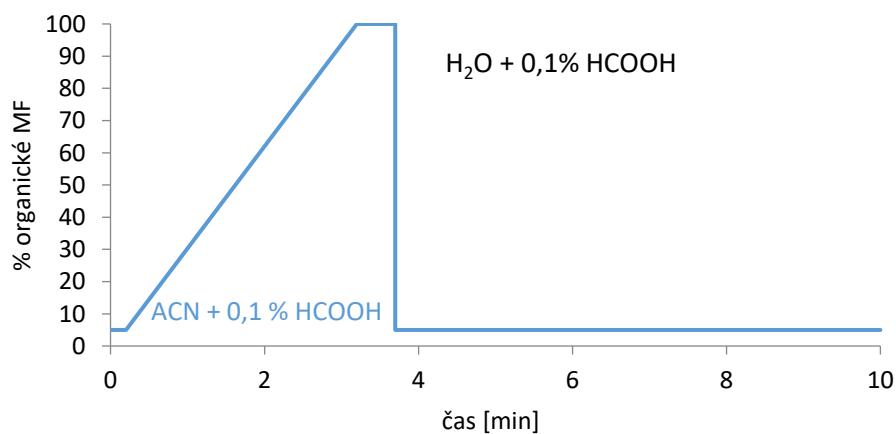
Obr. 20 Schéma gradientu 30 minutové metody v rámci identifikačního experimentu 1.

Při druhém experimentu došlo při měření k úpravě gradientu. Díky této změně došlo k výraznému vylepšení separace jednotlivých metabolitů. Celková optimalizace podmínek metody pro identifikaci metabolitů však nebyla cílem této diplomové práce. Výsledný 50minutový gradient pro identifikační experiment je uvedený na Obr. 21.

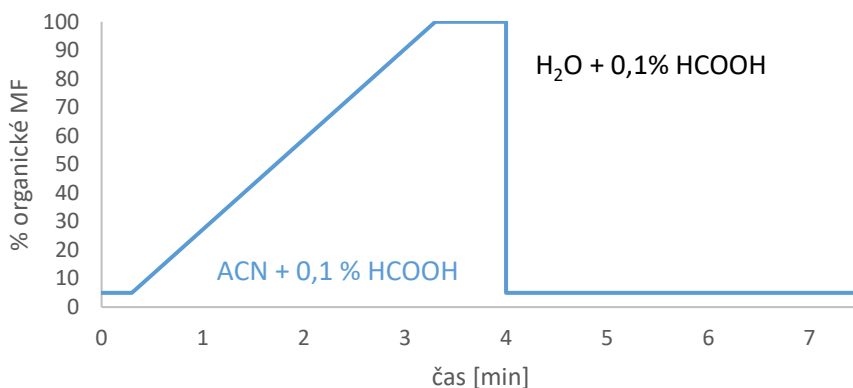


Obr. 21 Schéma gradientu optimalizované 50minutové identifikační metody (experiment 2).

Pro kvantifikaci byla zvolena rychlejší 10minutová metoda (teplota 27 °C; kolona Kinetex C18 EVO, 50 × 2,1 mm), jejíž průběh gradientu je uveden na Obr. 22. Na Obr. 23 je zobrazen gradient MF použitý v rámci experimentu 4 (teplota 27 °C; Kinetex C18 EVO, 50 × 2,1 mm). Jde o 7,5minutovou metodu.



Obr. 22 Schéma gradientu 10minutové kvantifikační metody.



Obr. 23 Schéma gradientu metody pro mikrosomálně stabilitní studii (experiment 4).

Pro Full-MS měření měl analyzátor nastaven hmotnostní rozsah 50 – 750  $m/z$  a disponoval rozlišením 70 000. AGC (kontrola automatického zisku) hodnota byla  $5 \times 10^6$ .

Při PRM měření byla nastavena normalizovaná kolizní energie (NCE) nejprve na  $-90$ , ale poté, co vznikala spektra s velmi rozsáhlou fragmentací, byla snížena na  $-70$ . Pro fragmentaci byly vybrány poměry  $m/z$  – 291,14919 ( $M + H^+$  7-fenoxytakrinu), 307,14410 ( $M + H^+$  monohydroxylovaných metabolitů) a 323,13902 ( $M + H^+$  dihydroxylovaných metabolitů). Rozlišení hmotnostního analyzátoru bylo 17 500. Hodnota AGC byla nastavena na  $1 \times 10^6$ .

## 3.8 Vyhodnocení

Data byla získávána z programu Chromeleon a Xcalibur a následně byla vyhodnocována. Byly extrahovány iontové chromatogramy, hmotnostní a fragmentační spektra.

### 3.8.1 Vyhodnocení identifikačních experimentů

Na základě dat byly určovány struktury fragmentů parentní látky a dále fragmenty metabolitů. Následně jsme se pokusili na základě fragmentů jednotlivých metabolitů navrhnout strukturu metabolitu.

Pro predikci možných vznikajících fragmentů posloužil program MassFrontier. MassFrontier je program, který ze známé struktury molekuly parentní látky na základě algoritmů a experimentálních spektrálních a fragmentačních knihoven predikoval možné struktury fragmentů. Navržené struktury fragmentů byly překresleny do programu ChemDraw, ze kterého byly následně získány další teoretické informace

o konkrétním fragmentu – přesná  $m/z$ , izotopová obálka a elementární složení.

Samotné navržení struktury jednotlivých fragmentů probíhalo na základě shody teoretické a naměřené experimentální hodnoty  $m/z$ . Identifikace probíhala na hmotnostním spektrometru, který pracoval s vysokou přesností a správností určení  $m/z$ . Aby bylo možné navrženou a experimentálně zjištěnou strukturu fragmentu považovat za totožnou, byla nutná shoda na alespoň tři desetinná místa. Nutná byla rovněž shoda navržené teoretické a experimentálně naměřené izotopické obálky. Dále byla pro usnadnění navržení konkrétní struktury fragmentu z fragmentačního spektra využita predikce sumárního vzorce pomocí programu Xcalibur zadáním očekávaných chemických prvků v daném iontu – v našem případě C, H, N a O.

### **3.8.2 Vyhodnocení kvantifikační a mikrosomálně stabilitní studie**

V rámci této diplomové práce se prováděla i kvantifikační a mikrosomálně stabilitní studie. Sledoval se úbytek parentní látky v čase a nárůst intenzity metabolitů. Pro kvantitativní stanovení fenoxytakrinu byla sestavena kalibrační řada, která se proměřila, následně se nastavila softwarově procesní metoda a v programu ThermoXcalibur se výsledky vyhodnotily metodou lineární regrese. V experimentu 4 byl pro mikrosomálně stabilitní stanovení použit vnitřní standard a na základě poměru plochy vzorku a plochy IS byla zjištěna koncentrace parentní látky.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Metabolismus léčiv, jako jeden z farmakokinetických parametrů, je nutné sledovat, protože může významně změnit farmakologický profil léčiva, například vznikem metabolitů zodpovědných za biologickou aktivitu nebo také toxicitu [70].

Pro *in vitro* biotransformační studie jsou jednou z možností volby lidské jaterní mikrosomy, které simulují metabolickou aktivitu jaterních lidských buněk. Nicméně je nutné vzít v úvahu, že mikrosomální metabolická aktivita může být rozdílná od metabolické aktivity v lidských jaterních buňkách. Jednou z dalších nevýhod je omezená inkubační doba, kdy aktivita enzymů rapidně klesá po několika hodinách inkubace [72]. Na základě těchto informací musíme brát v úvahu, že naše studie je zjednodušená studie metabolismu, a proto je možné, že se metabolismus léčiva *in vivo* může lišit.

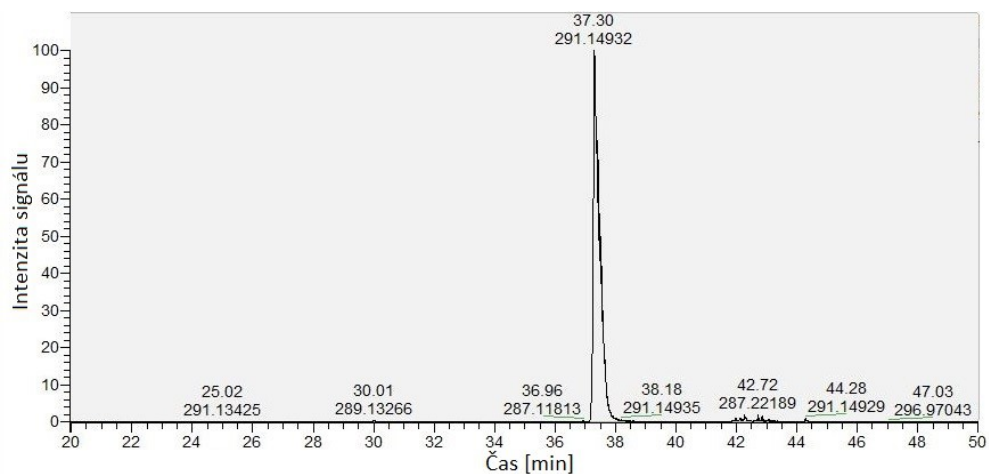
### 4.1.1 Identifikační experiment

Jedním z dílčích cílů práce byla identifikace fragmentů vznikajících při PRM z parentní látky a jednotlivých vznikajících metabolitů. K identifikaci byla využita vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie, predikce fragmentů MassFrontierem, sumární vzorec predikovaný programem Xcalibur a porovnávání izotopických obálek jednotlivých fragmentů.

Základem pro celou studii je správná metodika experimentu a správné nastavení parametrů analytické metody, v našem případě LC-MS/MS metody. Vycházeli jsme ze studie dle Nepovimové et al, 2015 [70]. Identifikace proběhla za využití tandemové MS-MS analýzy Q-orbitrapu. Měřilo se v pozitivním módu, protože se předpokládala protonizace molekuly.

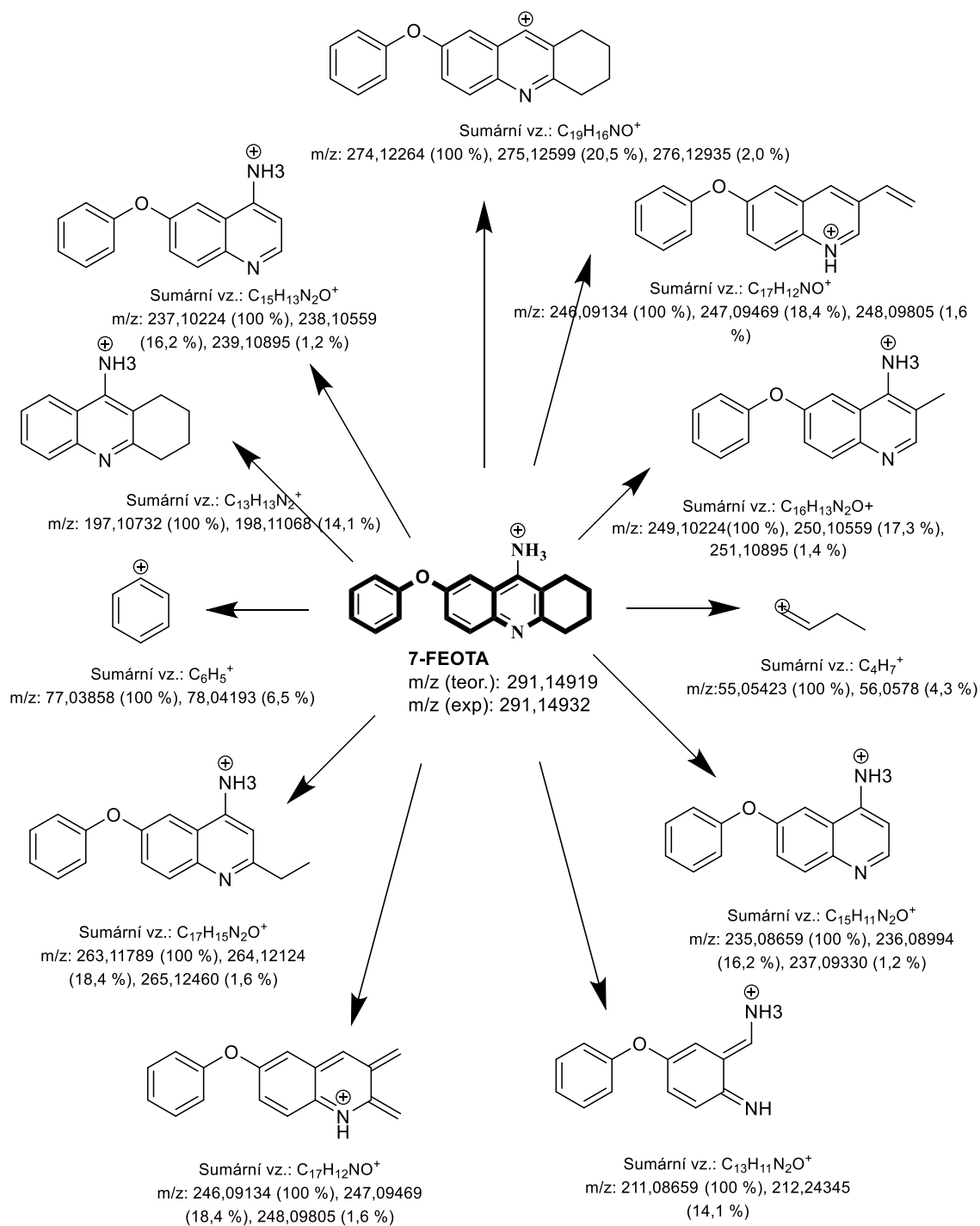
### PARENTNÍ LÁTKA

V prvním kroku byla nejprve proměřena parentní látka 7-FEOTA, viz Obr. 24. 7-fenoxytakrin má hodnotu jedenkrát nabitě molekuly  $m/z = 291,14932$  a na chromatogramu se eluuje v 37,30 minutě. Charakteristická izotopická obálka 7-fenoxytakrinu je uvedena na Obr. 19.

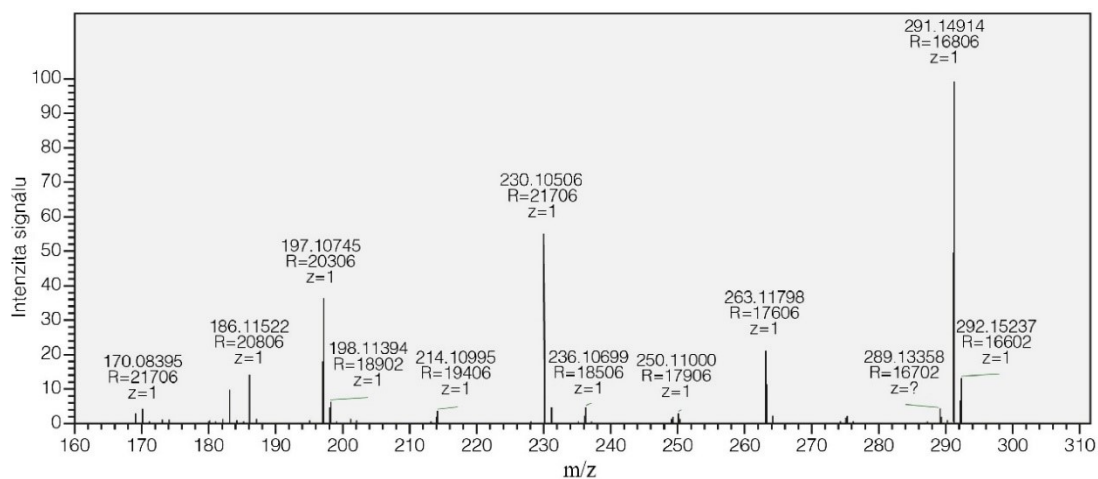


Obr. 24 Experimentálně stanovený chromatogram 7-FEOTY.

Pro snadnější určení vznikajících metabolitů, bylo nejdříve potřebné prostudovat fragmenty parentní látky – 7-FEOTY. MassFrontierem predikované fragmenty 7-FEOTY lze vidět na Obr. 25. Experimentálně naměřené fragmentační spektrum 7-FEOTY s  $m/z = 291,14932$  je zobrazeno na Obr. 26.



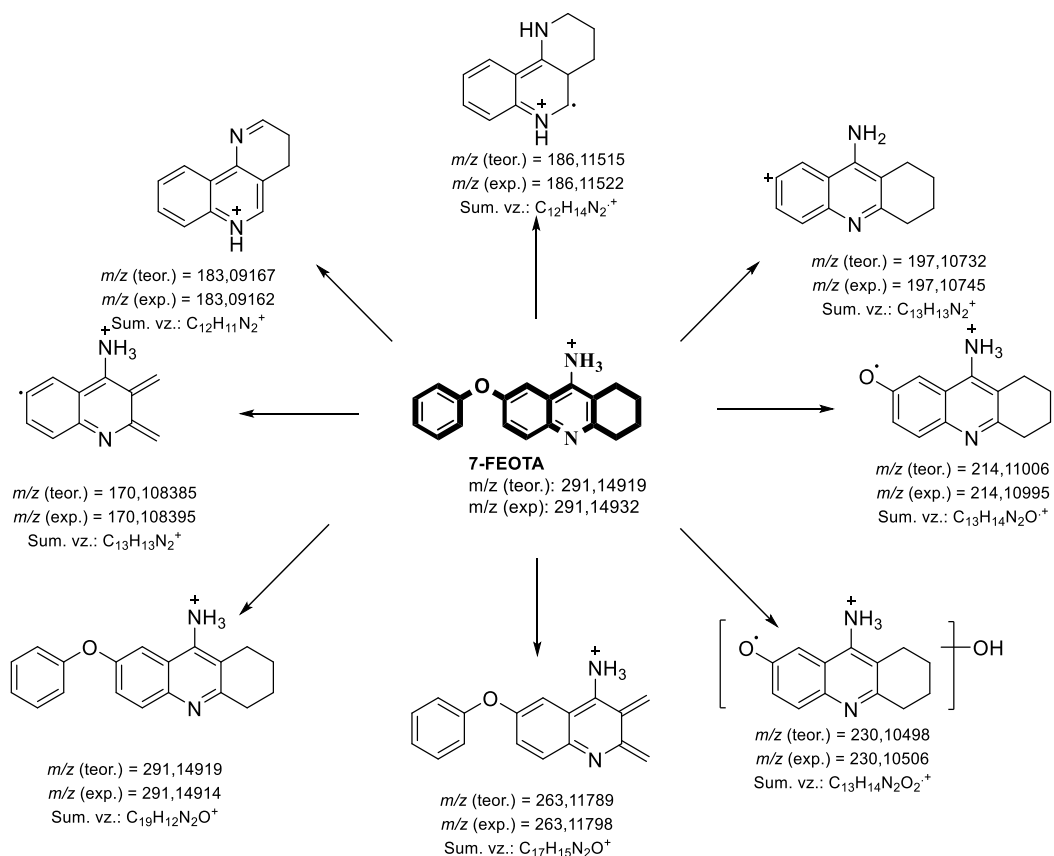
Obr. 25 MassFrontierem navržené struktury fragmentů 7-FEOTY.



Obr. 26 PRM spektrum 7-fenoxytakrinu.

Nejintenzivnějším iontem ve spektru je  $m/z = 291,14914$ , který odpovídá jednonásobně nabitému molekulárnímu iontu 7-FEOTY. Jako další intenzivní fragmenty 7-FEOTY jsou fragmenty  $m/z = 230,10506$ ;  $197,10745$ ;  $263,11798$  a  $186,11522$ . Návrh struktur těchto fragmentů probíhal na základě predikovaných struktur MassFrontierem a elementárního složení predikovaného programem Xcalibur. Námi navržené struktury fragmentů 7-FEOTY jsou zobrazeny na Obr. 27. U těchto struktur byla potvrzena i izotopická obálka.

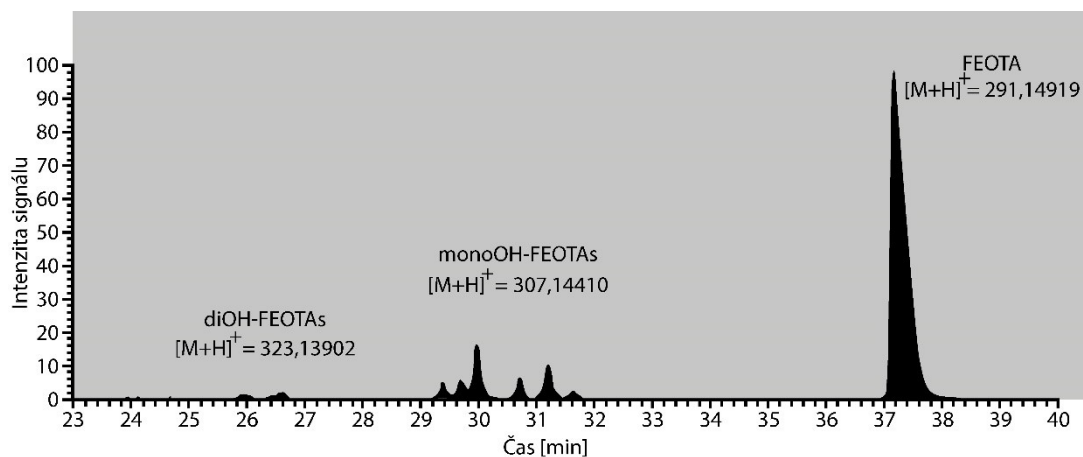




Obr. 27 Navržené struktury fragmentů 7-FEOTY.

## METABOLITY

Z chromatogramu 7-FEOTY naměřeného po inkubaci s mikrosomy je patrné, že vznikají dvě hlavní skupiny metabolitů se dvěma různými hodnotami  $m/z$  (307,14410 a 323,13902) (Obr. 28) Pro následnou fragmentaci byly tedy vybrány prekurzorové ionty s  $m/z = 307,14410$  a  $m/z = 323,13902$ .

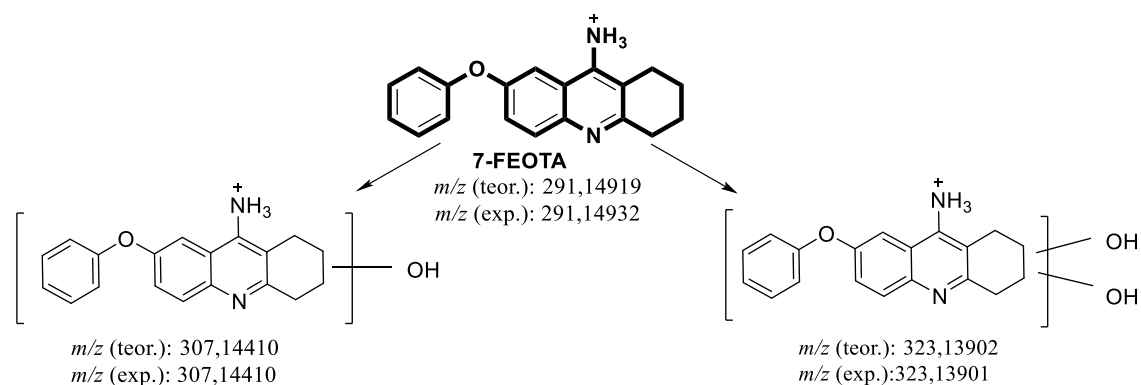


Obr. 28 Chromatogram 7-fenoxytakinu včetně označených pravděpodobných metabolitů.

Na základě rozdílu  $m/z = 291,1419$  a  $m/z = 307,1441$  bylo vydedukováno, že v případě první skupiny by mohlo jít o zavedení OH skupiny do molekuly 7-FEOTY. Jak již bylo uvedeno výše, zavedením hydroxy-skupiny v první fázi metabolizace do molekuly vede ke vzniku hydrofilnějšího produktu. Tato myšlenka byla dále podpořena faktem, že v I. fázi metabolizace takrinu je hydroxylace rovněž majoritní cestou eliminace. V rámci námi zvolených chromatografických podmínek se pohybujeme na reverzních fázích, z čehož vyplývá, že by se dle teorie měly hydroxylové metabolity eluovat s nižším retenčním časem v porovnání s parentní látkou. Tento teoretický bod byl rovněž prokázán i v rámci našeho měření, jelikož parentní látka se eluuje v čase 37,30 min a její monohydroxylované metabolity v rozmezí 29,50 – 31,78 min. Z výše uvedených teoretických poznatků vyplývá, že by se tedy mělo s největší pravděpodobností jednat o monohydroxylaci molekuly. Nicméně tuto domněnku je vhodné ověřit interpretací jednotlivých spekter.

Druhá skupina metabolitů s  $m/z = 323,1390$  má hmotnostní odchylku od parentní látky fenoxytakrinu  $m/z = 291,14932$  o  $31,9897 m/z$ . Tato odchylka pravděpodobně odpovídá dvojnásobné hydroxylaci molekuly.

Na základě těchto informací tedy predikujeme, že 7-fenoxytakrin se v I. fázi *in vitro* biotransformace pravděpodobně přeměňuje z 90 % na monohydroxylované a z 10 % na dihydroxylované metabolity (Obr. 29). V dalším kroku bylo cílem diplomové práce zjistit polohu hydroxylové skupiny, resp. skupin. Nabízelo se několik možných variant.

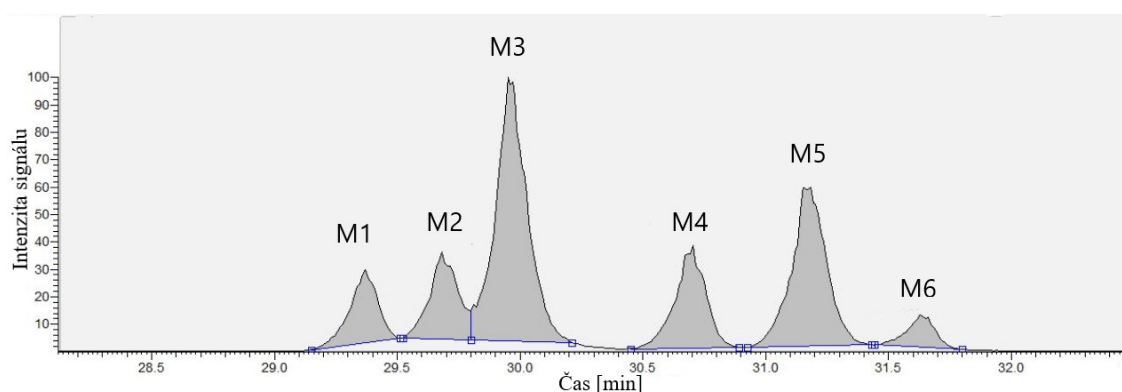


Obr. 29 Předpokládané vznikající mono- a dihydroxylované metabolity 7-fenoxytakrinu.

## MONOHYDROXYLOVANÉ METABOLITY

Na extrahovaném iontovém chromatogramu (EIC) s  $m/z = 307,1441$  lze

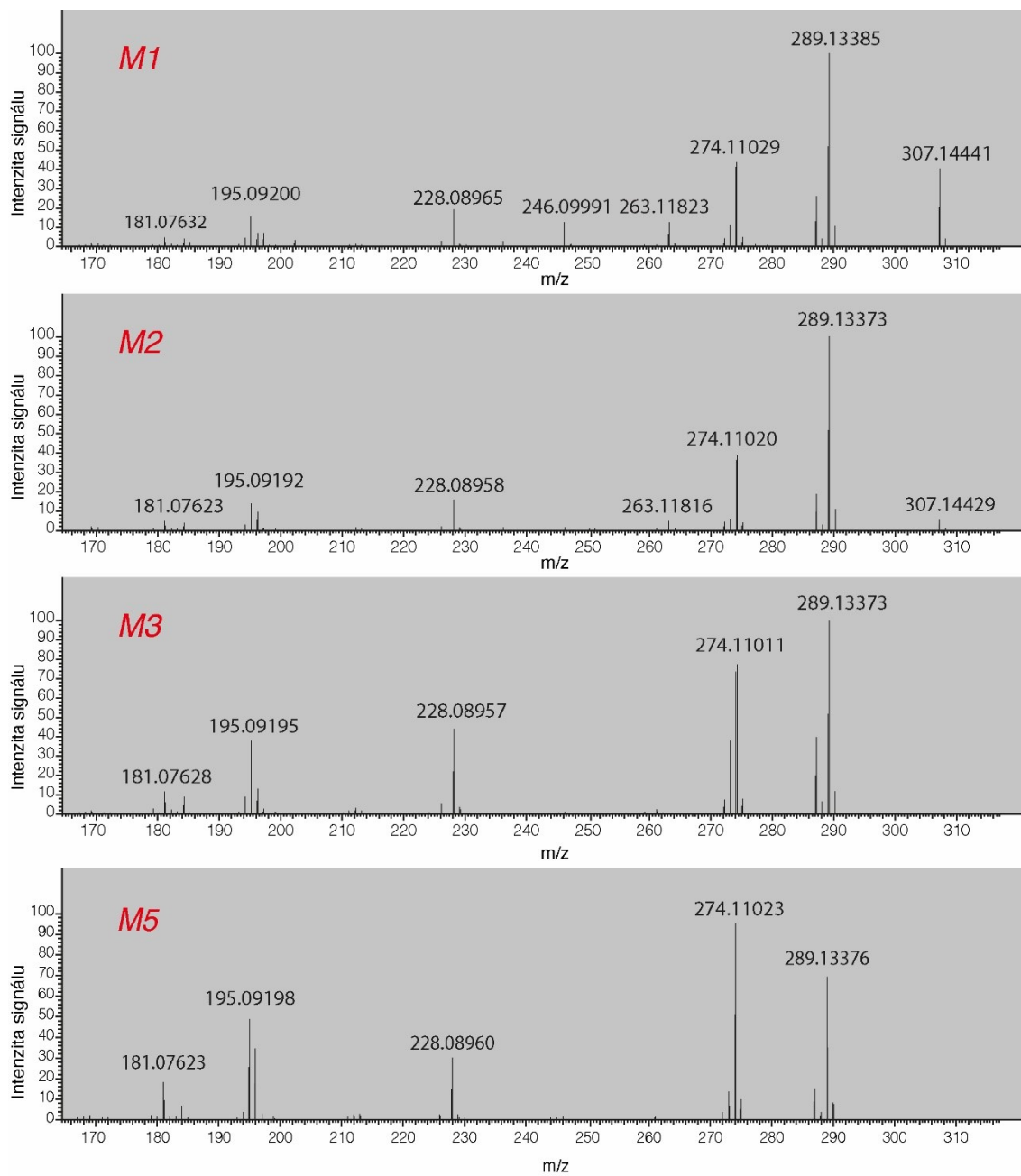
pozorovat 6 monohydroxylovaných metabolitů vznikajících ze 7-FEOTY, viz Obr. 30. Metabolity jsou označeny M1 – M6 a jsou řazeny postupně dle retenčních časů od nejpolárnějšího metabolitu. Na základě porovnávání fragmentačních spekter jednotlivých metabolitů jsme rozdělily monohydroxylované metabolity do dvou skupin (Obr. 31 a Obr. 35). Do první skupiny (Obr. 31) spadají metabolity M1, M2, M3 a M5. Tyto čtyři metabolity se vyznačují velmi podobnými kolizními spektry. Druhou skupinu (Obr. 35) pak tvoří metabolity M4 a M6, které mají navzájem též velmi podobná spektra, avšak od první skupiny se do jisté míry liší.



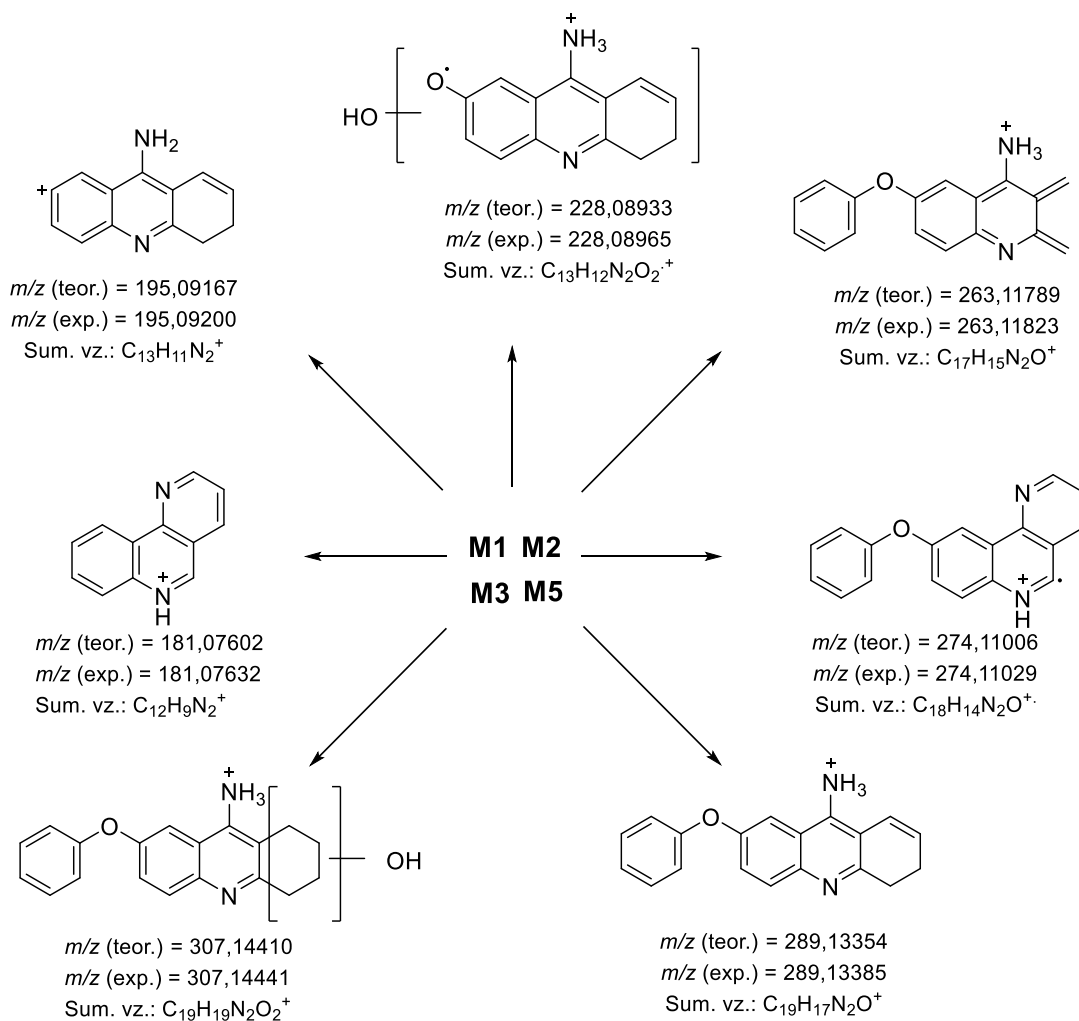
Obr. 30 EIC záznam monohydroxylových metabolitů o  $m/z = 307,1441$ .

#### **Metabolity M1, M2, M3 a M5:**

Jako první monohydroxylovaný metabolit je metabolit M1, který je eluován v 29,52 minutě. Metabolit M2 je eluován v 29,86 minutě. Nejintenzivnějším monohydroxylovaným metabolitem je M3, který je eluován v 30,14 minutě. Do této skupiny monohydroxylovaných metabolitů, které se vyznačují velmi podobnými fragmentačními spektry, ještě řadíme metabolit M5, který je eluován v 31,36 minutě a jde o druhý nejintenzivnější monohydroxylovaný metabolit. Fragmentační spektra monohydroxylovaných metabolitů M1, M2, M3 a M5 jsou uvedeny na Obr. 31.



Obr. 31 Fragmentační spektra metabolitů M1, M2, M3 a M5 s označenými nejintenzivnějšími fragmenty.

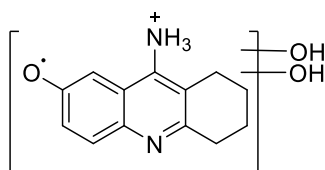


Obr. 32 Navržené struktury fragmentů M1, M2, M3 a M5.

Z fragmentačních spekter (Obr. 31) lze vidět opakovaný výskyt jistých fragmentů. Navržené struktury těchto fragmentů jsou zobrazeny na Obr. 32. Co se týče rozdílu mezi jednotlivými spektry této skupiny monohydroxylovaných metabolitů, tak lze vidět zejména v intenzitě některých fragmentů. Intenzita fragmentů se značně mění u molekulárního iontu, kdy v pořadí od M1 po M5 postupně  $m/z = 307,14441$  ubývá a u metabolitu M3 a M5 není ve fragmentačních spektrech M3 a M5 vidět. Z toho můžeme vyvodit, že metabolity M1 a M2 budou více stabilní než metabolity M3 a M5. Naopak v případě  $m/z = 274,11029$  je intenzita nejvýraznější u M5 a postupně k M1 klesá.

Dále čeho je možné si ve fragmentačním spektru M1 povšimnout, je fragment  $m/z = 246,09991$  (Obr. 33), který se v ostatních spektrech této skupiny

monohydroxylovaných metabolitů nevyskytuje. Navržená struktura tohoto fragmentu je zobrazena na Obr. 33.



$m/z$  (teor.) = 246,09981

$m/z$  (exp.) = 246,09991

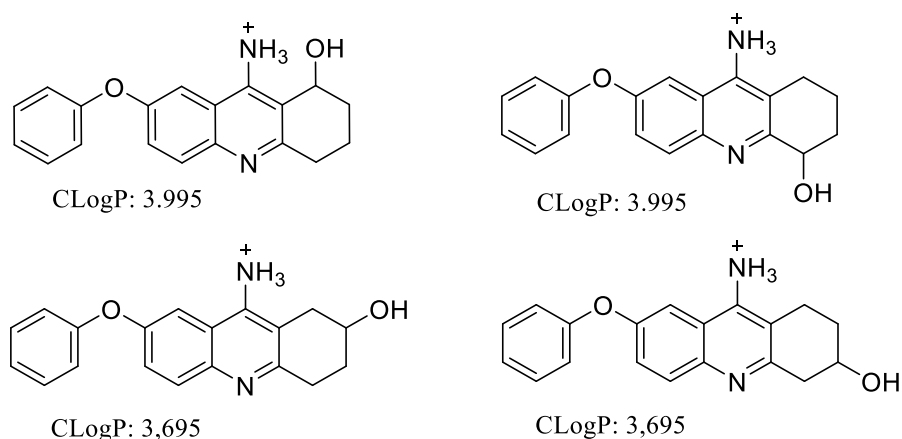
Sum. vz.: Programem Xcaibur nebyl žádný vyhovující predikován.

Obr. 33 Navržená struktura fragmentu  $m/z = 246,09991$  vyskytující se ve spektru M1.

U této první skupiny metabolitů M1, M2, M3 a M5 předpokládáme polohu hydroxylové skupiny na nasycené části akridinu, tzn. v polohách 1 – 4 7-FEOTY. Tato naše hypotéza vychází za prvé z fragmentu  $m/z = 228,08933$ , který nám vyloučil polohy hydroxylových skupin na fenoxyskupině. Nejzásadnějším faktem, na základě kterého predikujeme polohu hydroxylových skupin na nasycené části molekuly u metabolitů M1, M2, M3 a M5 je fragment  $m/z = 289,13385$ , kde rozdíl mezi molekulárním iontem  $m/z = 307,14429$  a tímto fragmentem odpovídá  $\Delta m/z = 18$ . Tato odchylka vypovídá o rozdílu hydroxy-skupiny a současném zavedení dvojně vazby do molekuly. Vznik fragmentu s touto dvojnou vazbou vyloučil možnost polohy hydroxylové skupiny v polohách 5, 6 a 8, protože pokud by se vyskytovala hydroxylová skupina právě v těchto polohách, nevznikal by takovýto fragment. Podobně je to u fragmentu  $m/z = 195,09195$ , který v rozdílu  $\Delta m/z$  mezi molekulárním iontem a tímto fragmentem kromě odštěpení hydroxy-skupiny a zavedení dvojně vazby, navíc zahrnuje odštěpení fenoxyskupiny. Dalším z důvodů, proč predikujeme hydroxy-skupiny na nasycené části molekuly, je, že metabolity M1, M2, M3 a M5 jsou metabolity s velmi podobným fragmentačním spektrem, a proto je předpokládána vzájemná podobnost těchto metabolitů. Z logiky věci jsou pouze čtyři volné pozice na molekule tak, aby si metabolity zachovaly podobnost, a to tedy pouze na nasycené části molekuly. Dále je tato teorie podpořena studií Patočka et al, 2008 [11] týkající se metabolismu takrinu, u kterého taktéž vznikají primárně hydroxylované metabolity v nasycené části akridinové struktury.

Dále bychom mohli na základě logP a retenčního času metabolitu určit možné pořadí těchto monohydroxylovaných metabolitů v chromatogramu. Dle Obr. 34 můžeme vidět dvě teoreticky možné vznikající skupiny hydroxylovaných

7-fenoxytarinů. 1-hydroxy-7-fenoxytakrin a 4-hydroxy-7-fenoxytakrin s ClogP = 3,995 a 2- a 3-hydroxy-7-fenoxytakrin s ClogP = 3,695. Na základě těchto informací můžeme usoudit, že pokud by se hydroxylová skupina vyskytovala v poloze 1 nebo 4, tak by tyto metabolity byly eluovány až po hydroxylovaných metabolitech v poloze 2 a 3. Z toho vyplývá, že pravděpodobně M1 a M2 odpovídá 7-fenoxytakrinu hydroxylovaným v poloze 2 nebo 3. A u M3 a M5 predikujeme tyto hydroxylaci v polohách 1 nebo 4.



Obr. 34 Hydroxylované 7-fenoxytakriny s určenou ClogP.

Tuto naši hypotézu jsme dále podpořili informací o stabilitě molekulárního iontu  $m/z = 307,14429$ , který byl intenzivnější ve fragmentačních spektrech M1 a M2. Ze sterického hlediska předpokládáme, že 2- nebo 3-hydroxy-7-fenoxytakrin je stabilnější molekula, než 1- nebo 4-hydroxy-7-fenoxytakrin. Z tohoto důvodu jsme přiřadili fragmentační spektra se zachovalým molekulárním iontem (M1 a M2) právě metabolitům s hydroxylací v poloze 2 nebo 3. Bohužel jsme dále ze získaných informací nebyli schopni rozlišit M1 od M2 a M3 od M5.

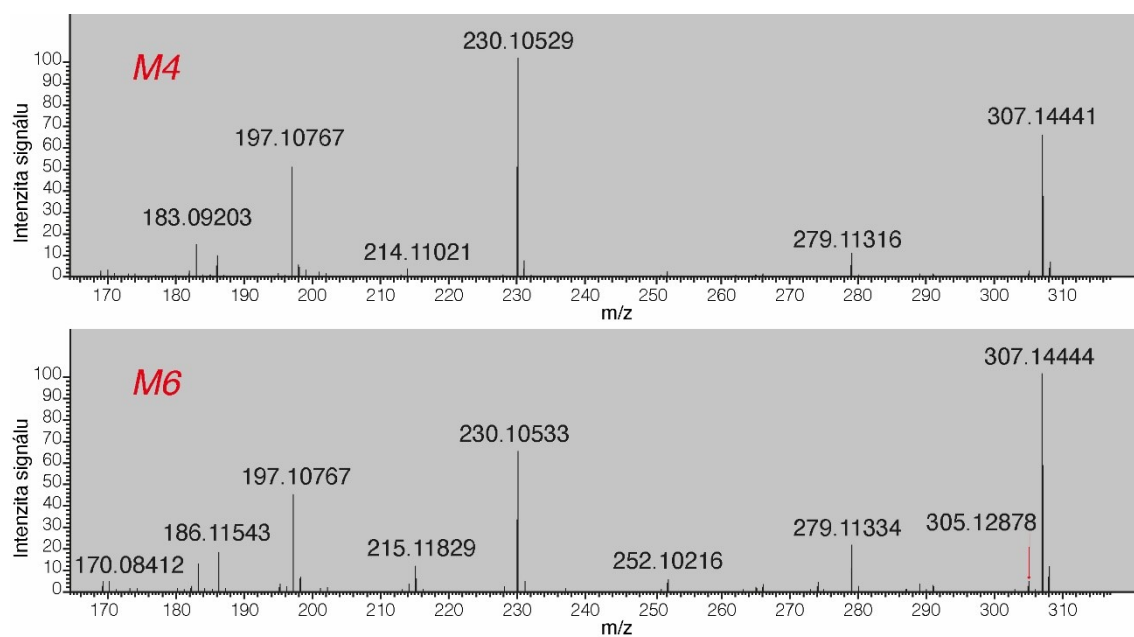
#### Metabolity M4 a M6:

Ve druhé skupině monohydroxylovaných metabolitů pak velmi podobná spektra měly metabolity M4 a M6 (Obr. 35), které navíc mají podobné fragmentační spektrum se samotným 7-fenoxytakrinem.

Metabolit M4 je eluován ve 30,85 minutě a metabolit M6 se eluuje v 31,78 minutě. Na základě fragmentačních spekter byly navrhovány struktury jednotlivých fragmentů, které jsou zobrazeny na Obr. 36. Podařilo se navrhnout několik struktur fragmentů, jejichž struktura byla potvrzena na základě hodnoty poměru  $m/z$ , sumárního

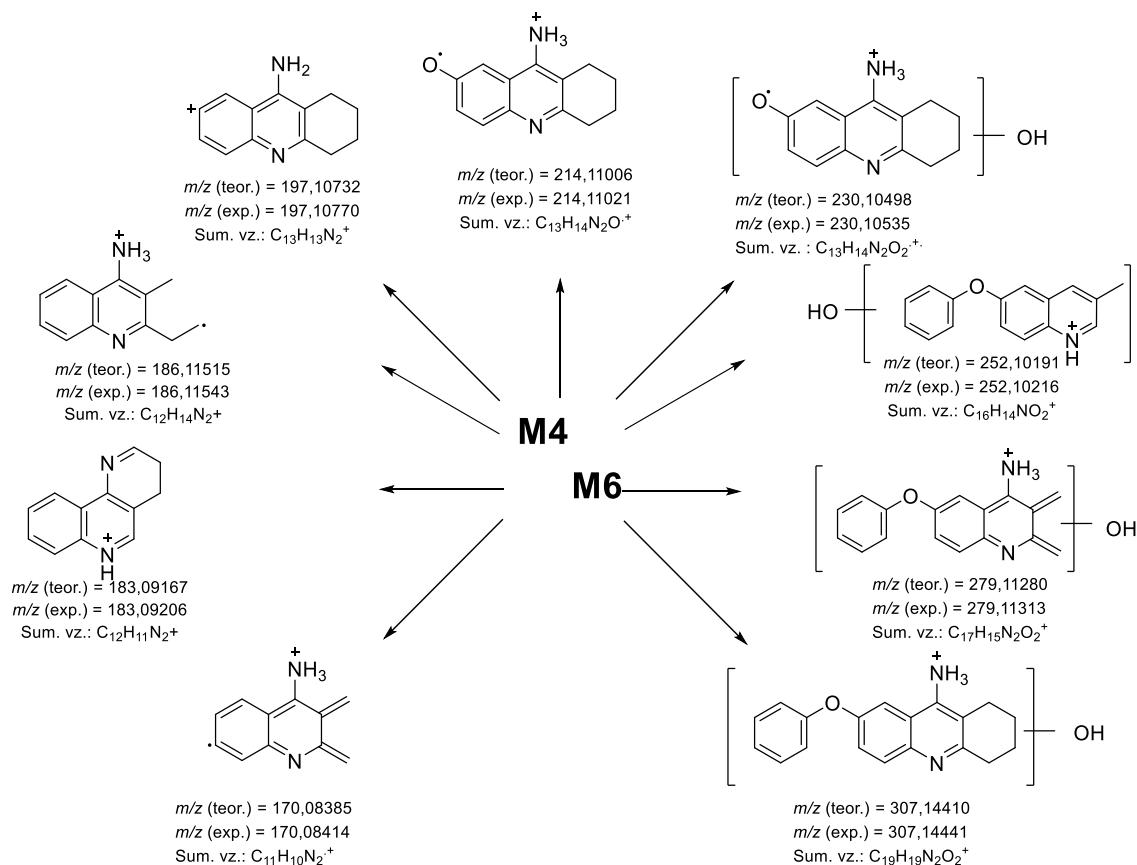
vzorce predikovaného v ChemDraw i v programu Xcalibur, a dále byla i vizuálně potvrzena izotopová obálka.

Z fragmentačních spekter metabolitu M4 a M6 je vidět, že se některé hmoty  $m/z$  v obou spektrech opět opakují a některé naopak chybí. Po porovnání fragmentačních spekter těchto dvou metabolitů můžeme vidět rozdíl v intenzitě hmoty  $m/z = 230,10535$ , která je v případě M4 intenzivnější než u M6. Dále ve spektru můžeme zpozorovat rozdíl intenzity molekulárního iontu  $m/z = 307,14453$ , která je naopak intenzivnější u M6. Další rozdílnost mezi těmito metabolity jsou u fragmentů  $m/z = 252,10216$  a  $m/z = 215,11829$ , které se ve spektru M4 vyskytovaly pouze v minimální intenzitě. Dále se spektra liší fragmentem  $m/z = 183,09203$ , který je intenzivnější u M4. Opačně je to u fragmentu  $m/z = 186,11543$ , který je intenzivnější u M6.



Obr. 35 Fragmentační spektrum M4 a M6.

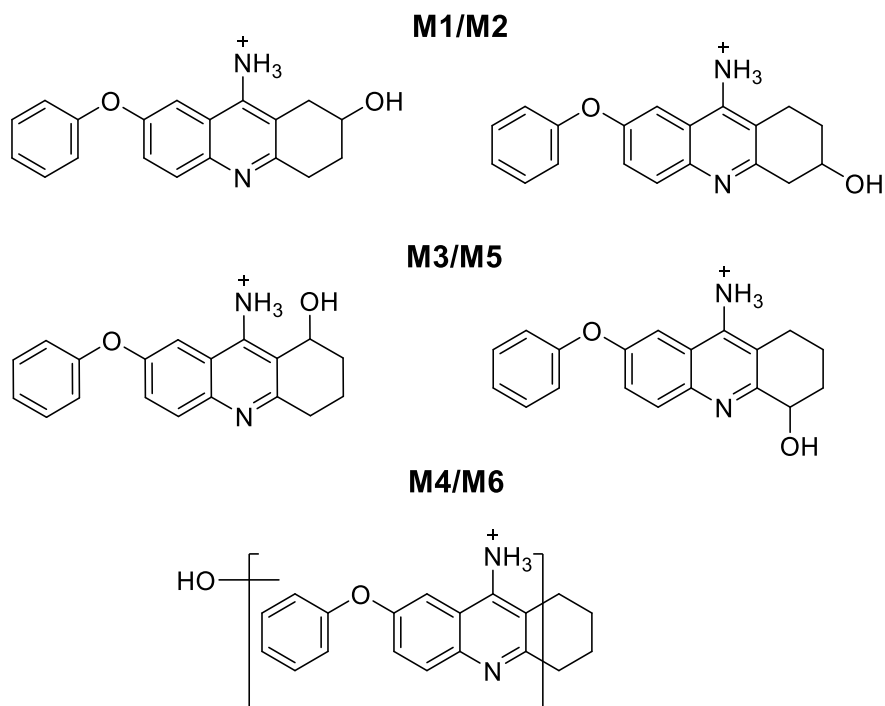




Obr. 36 Přehled navržených struktur fragmentů M4 a M6.

Na základě fragmentu  $m/z = 279,11313$  nalezeného ve spektrech metabolitů M4 a M6, který neumožňuje vznik dvojné vazby na nasycené části molekuly, predikujeme polohy hydroxylové skupiny u těchto metabolitů v aromatické části molekuly. Rovněž ionty s  $m/z = 197,10767$ ;  $214,11021$  a  $230,10529$  neindikují, že by se u těchto metabolitů měla hydroxy-skupina vyskytovat v nasycené části molekuly. Dalším důvodem je, že pokud by se potvrdily polohy hydroxylové skupiny u M1, M2, M3 a M5 na nasycené části molekuly, nemohly by tato místa obsazovat hydroxylové skupiny M4 nebo M6.

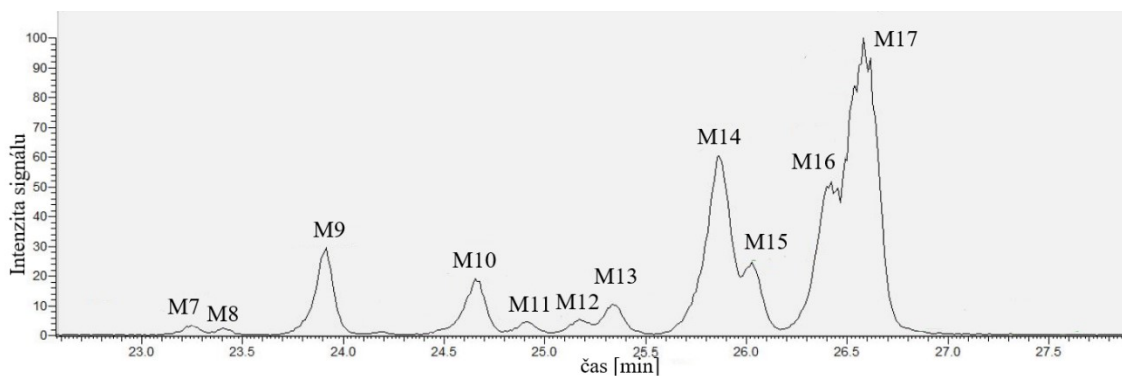
Souhrnný obrázek s námi navrženými strukturami monohydroxylovaných metabolitů je zobrazen na Obr. 37. Dále je nutné zmínit, že byly nalezeny stopy metabolitu 7-hydroxytakrinu, nicméně nejedná se o preferenční metabolickou cestu 7-FEOTY, a proto domnělá příčina toxicity by měla být minimalizována.



Obr. 37 Navržené struktury monohydroxylovaných metabolitů.

## DIHYDROXYLOVANÉ METABOLITY

Analogickým způsobem byly analyzovány a interpretovány i předpokládané dihydroxylované metabolity. V případě skupiny dihydroxylovaných metabolitů jich je dle chromatogramu (Obr. 38) předpokládáno 11 a jsou označovány opět dle retenčních časů od nejpolarnějšího jako M7 – M17. Pro dokonalejší separaci jednotlivých metabolitů by bylo vhodné provést důkladnější optimalizaci chromatografické metody. Tato optimalizace však nebyla cílem této diplomové práce.



Obr. 38 EIC dihydroxylovaných metabolitů o  $m/z = 323,13901$ .

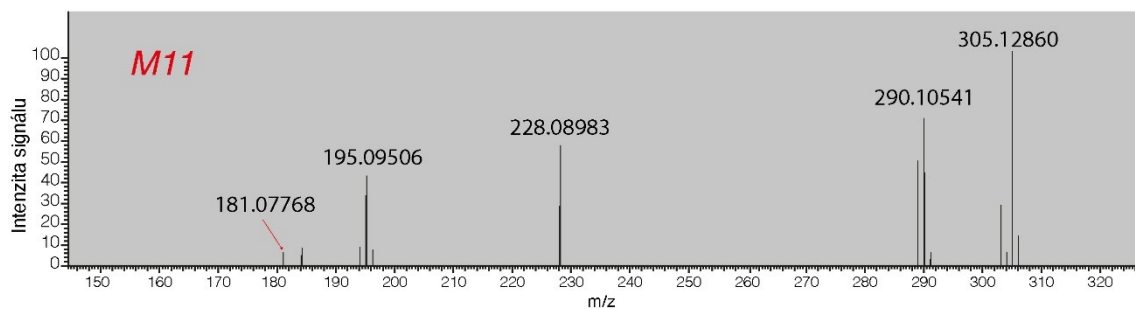
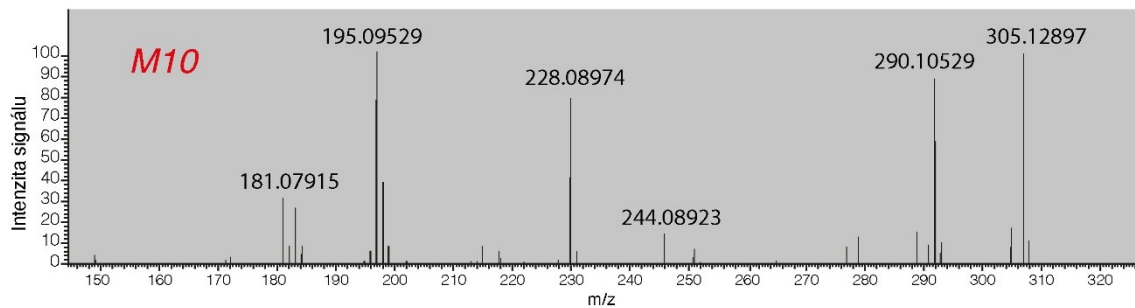
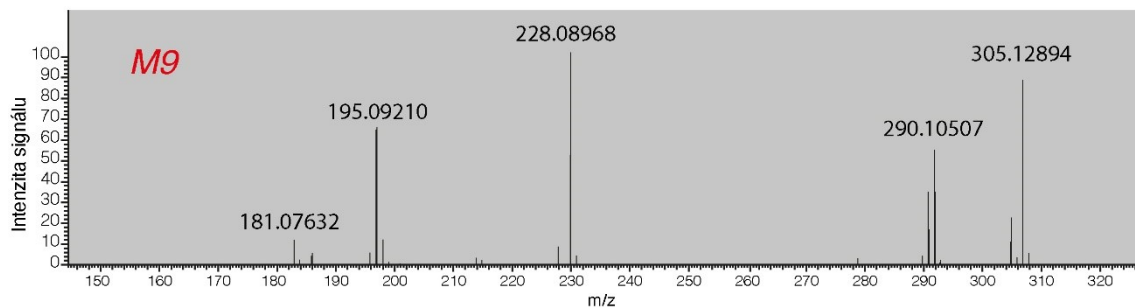
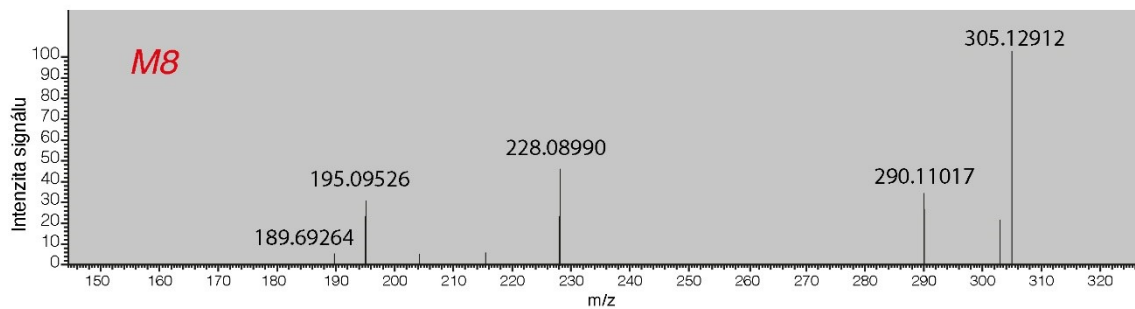
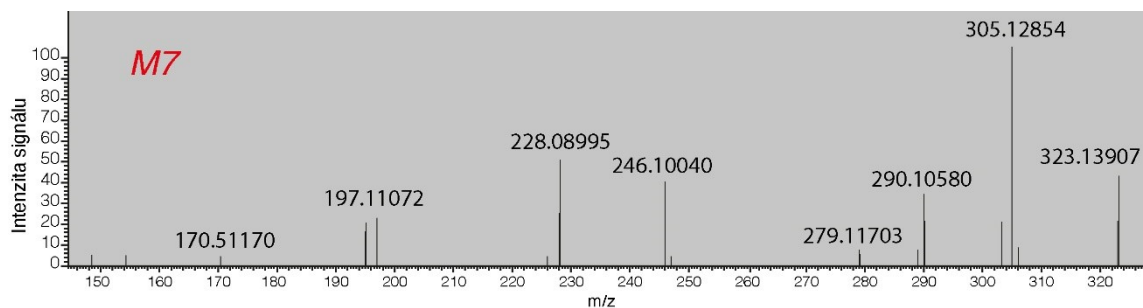
Na základě podobnosti fragmentačních spekter byly dihydroxylované metabolity podobně jako monohydroxylované metabolity rozděleny do dvou skupin. Do první

skupiny dihydroxylovaných metabolitů jsme zařadili M7 – M11, do druhé skupiny jsme pak zařadili metabolity M12 – M17.

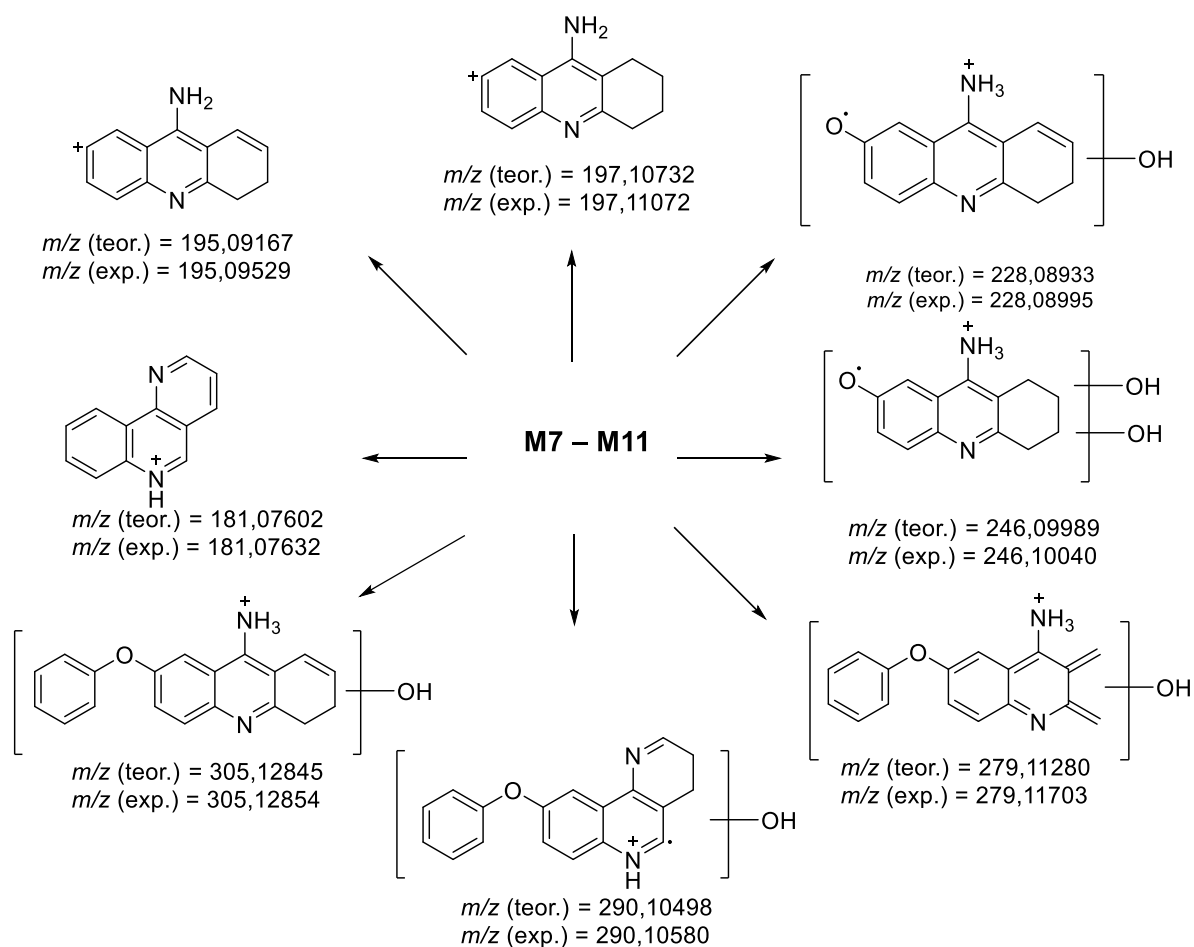
### **Metabolity M7 – M11:**

Jako nejpolárnější metabolit 7-FEOTY je v 23,24 minutě eluován metabolit M7. Metabolit M8 se eluuje ve 23,42 minutě a metabolit M9 v 23,91 minutě. Ve 24,65 minutě se eluuje metabolit M10. Podobné fragmentační spektrum má i M11, který se eluuje v 24,92 min. Jednotlivá spektra (Obr. 39) těchto dihydroxylovaných metabolitů byla rozebírána a porovnávána, následně byly navrhovány struktury fragmentů. Námi navržené struktury fragmentů dihydroxylovaných metabolitů M7 – M11 jsou zobrazeny na Obr. 40.

Molekulární iont  $m/z = 323,13907$  je zachován pouze u M7, u ostatních dihydroxylových metabolitů došlo k jeho úplně fragmentaci, a proto není v žádném fragmentačním spektru vidět. Pro rozlišení mezi jednotlivými dihydroxylovými metabolity této skupiny, bylo nutné podrobněji rozebírat jednotlivá spektra. M7 se od ostatních metabolitů liší fragmenty  $m/z = 279,11703$  a  $m/z = 246,10040$ , které u M8 – M11 nejsou k nalezení. U metabolitu M8 jsme pozorovali značný úbytek na intenzitě fragmentu  $m/z = 290,10580$ . U M9 nabývá největší intenzity fragment  $m/z = 228,08933$ . Fragment  $m/z = 181,07632$  je k nalezení u M9 a M10, pak dále v minimální intenzitě u M11. M10 se vyznačuje intenzivními fragmenty  $m/z = 195,09529$ ;  $m/z = 228,08995$ ;  $m/z = 290,10580$  a  $m/z = 305,12854$ , které jsou intenzivnější než u metabolitů M7, M8 a M9.



Obr. 39 Fragmentační spektra M7 – M11.



Obr. 40 Navržené sktruktury fragmentů metabolitů M7 – M11.

U dihydroxylovaných metabolitů M7 – M11 předpokládáme polohu jedné hydroxylové skupiny na nasycené části molekuly a druhou hydroxylovou skupinu předpokládáme v aromatické části molekuly, tzn. buď v polohách 5, 6, 7, anebo na fenoxyskupině 7-FEOTY. Predikce proběhla na základě fragmentů  $m/z = 228,10040$  a  $195,09506$  které predikují vznik jedné dvojně vazby, která může vznikat pouze v nasycené části molekuly. Fragmentsy  $m/z = 287,11816$ ;  $226,07776$  a  $194,08734$ , které by predikovaly vznik dvou dvojných vazeb na nasycené části molekuly, nebyly v těchto fragmentačních spektrech zaznamenány, a proto je předpoklad pro druhou hydroxylovou skupinu na aromatické části molekuly.

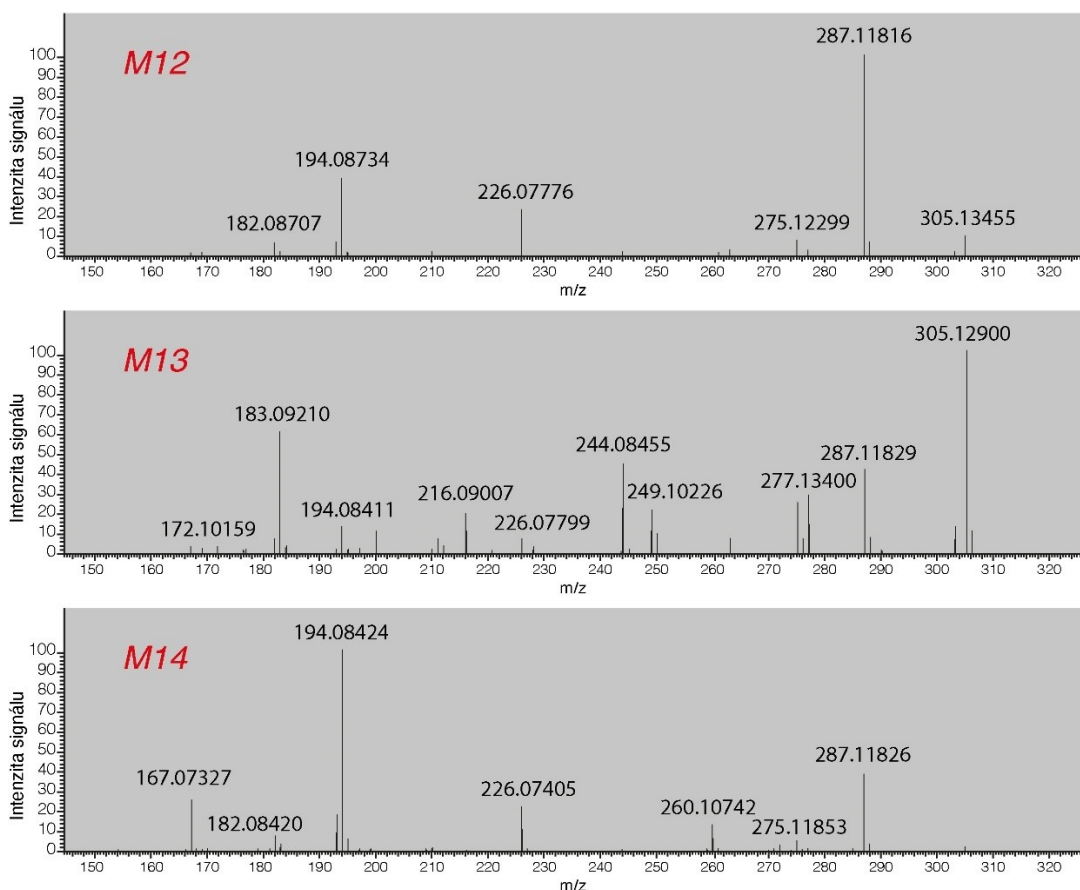
#### Metabolity M12 až M17:

Pro přehlednost byla vytvořena tabulka s retenčními časy M12 – M17 (Tab. 8).

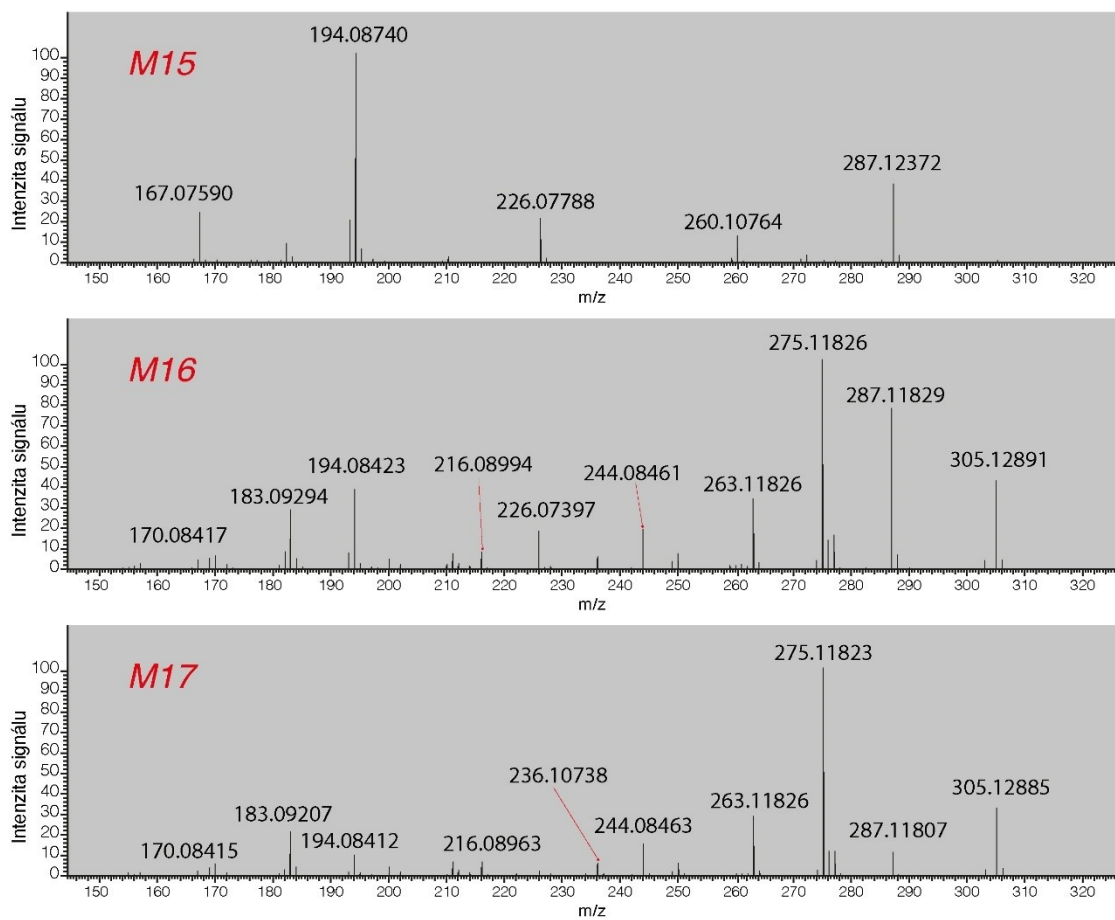
Tab. 8 Přehled retenčních časů M12 – M17.

Metabolit	Retenční čas [min]
M12	25,18
M13	25,33
M14	25,87
M15	26,03
M16	26,49
M17	26,53

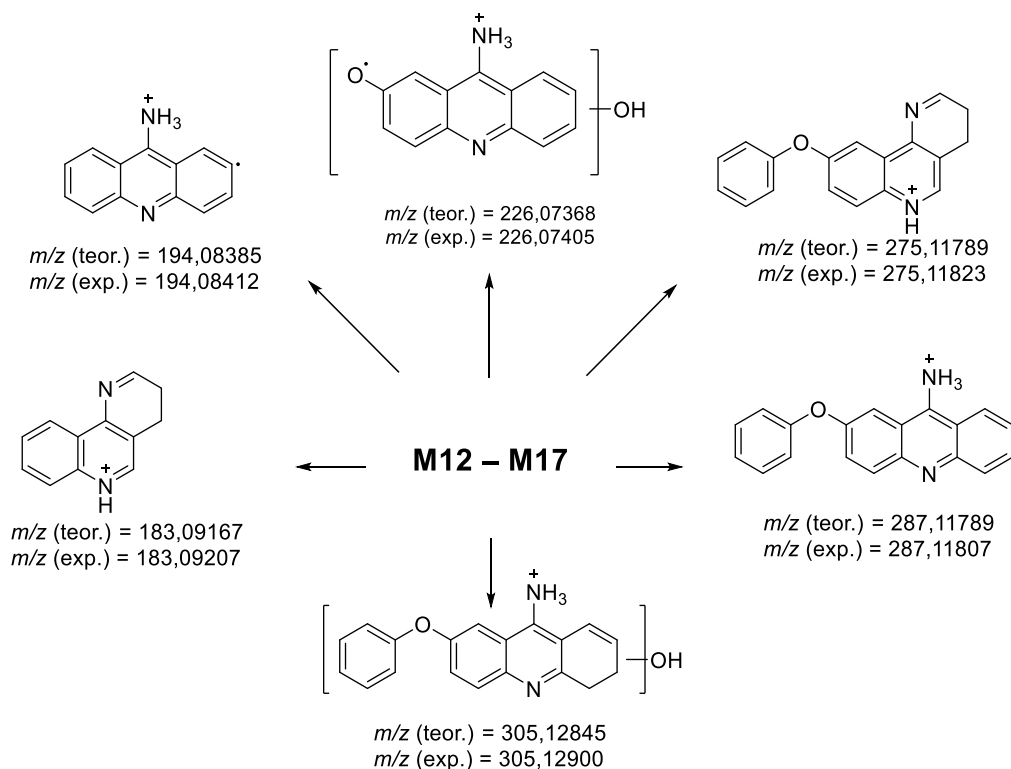
Na Obr. 41 a Obr. 42 jsou uvedeny fragmentační spektra metabolitů M12 – M17. Fragmentační spektra této skupiny dihydroxylovaných metabolitů měly několik podobných fragmentů, jejichž přehled je zobrazen na Obr. 43. Dále jsou níže popsány zpozorované rozdíly mezi těmito jednotlivými metabolity. Nutno dodat, že molekulární iont  $m/z = 323,13901$  byl opět celý rozfragmentován, a proto nelze ve spektrech nalézt.



Obr. 41 Fragmentační spektra metabolitů M12 – M14.

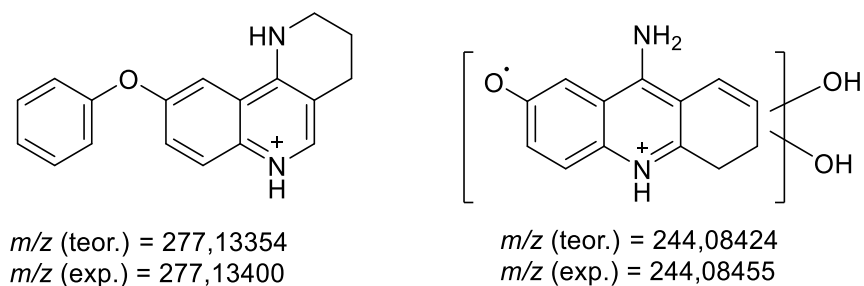


Obr. 42 Fragmentační spektra metabolitů M15 – M17.



Obr. 43 Navržené struktury fragmentů společné pro metabolity M12 – M17.

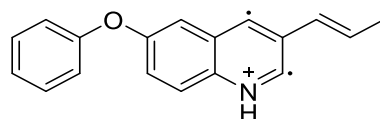
Ve fragmentačním spektru M12 jsme zpozorovali největší intenzitu u fragmentu  $m/z = 287,11807$ . Intenzita tohoto fragmentu klesla u M13. Avšak M13 má výrazné fragmenty  $m/z = 305,12455$  a  $m/z = 183,09207$ . Ve fragmentačním spektru M13 dále můžeme navíc zpozorovat fragmenty  $m/z = 244,08455$  a  $m/z = 277,13400$  (Obr. 44).



Obr. 44 Navržené struktury fragmentů typických pro M13.

Ve spektrech M14 a M15 je navíc oproti ostatním dihydroxylovaným metabolitům fragment  $m/z = 260,10742$ , jehož pravděpodobná struktura je zobrazena na Obr. 45. Dále je možné si všimnout  $m/z = 194,08424$ , který u M14 a M15 nabývá výrazné intenzity.

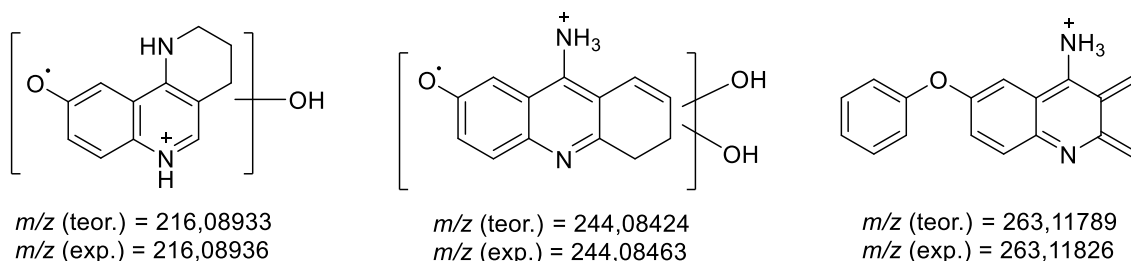




$m/z$  (teor.) = 260,10699  
 $m/z$  (exp.) = 260,10742

Obr. 45 Fragment  $m/z = 260,10742$  typický pro M14 a M15.

Metabolit M17 je nejintenzivnější dihydroxylovaný metabolit. Spektrem se velmi podobná M16. Od ostatních metabolitů této dihydroxylové skupiny se tyto dva metabolity odlišují fragmenty  $m/z = 216,08963$ ;  $m/z = 244,08463$  a  $m/z = 263,11826$ , viz Obr. 46. Dále si nelze nepovšimnout značné intenzity fragmentu  $m/z = 275,11823$ . Nicméně od sebe navzájem tyto dva metabolity nebylo z doposud zjištěných informací možné rozlišit.

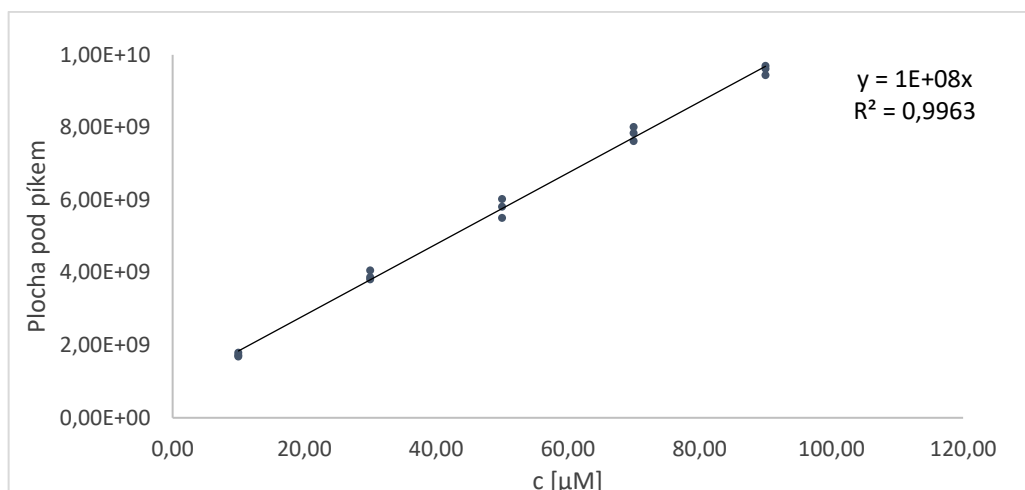


Obr. 46 Navržené struktury fragmentů metabolitů M16 a M17.

V případě skupiny metabolitů M12 – M17 předpokládáme polohu obou hydroxylových skupin v nasycené části molekuly 7-FEOTY. Hypotéza vznikla na základě experimentálně zjištěných dat, podobně jako v případě monohydroxylových metabolitů. Fragments  $m/z = 287,11816$ ;  $226,07776$  a  $194,08734$  vyloučily polohy hydroxylových skupin na aromatických částech molekuly, protože rozdíl  $\Delta m/z$  mezi molekulárním iontem a těmito  $m/z$  predikuje vznik dvou dvojných vazeb, které mohou vzniknout pouze v nasycené části molekuly (Obr. 47).

Z důvodu podobnosti fragmentačních spekter jednotlivých dihydroxylových metabolitů, většího počtu vznikajících metabolitů a velkého počtu a kombinací míst hydroxylace na 7-fenoxytakrinu, není dále z našich experimentálních dat možné jednotlivé dihydroxylované metabolity od sebe více rozlišit. Námi zjištěné a navržené struktury dihydroxylovaných metabolitů jsou proto pouze schématicky ilustrovány na Obr. 47.

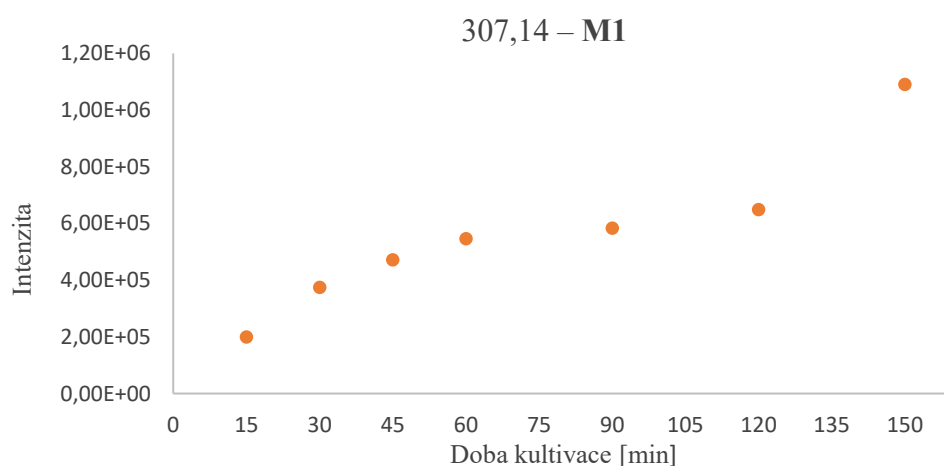




Obr. 48 Graf kalibrační křivky 7-FEOTY vytvořený z dat z hmotnostního spektrometru.

Z rovnice přímky byla dopočítána koncentrace parentní látky. Bohužel v tomto experimentu nebyl pozorován signifikantní pokles koncentrace FEOTY, pouze byl pozorován mírný nárůst intenzity metabolitů. Důvodem může být vysycení mikrosomů nebo spotřeba RapidStartu, proto bylo následně nutné provést mikrosomálně stabilitní experiment s nižší koncentrací zásobního roztoku FEOTY.

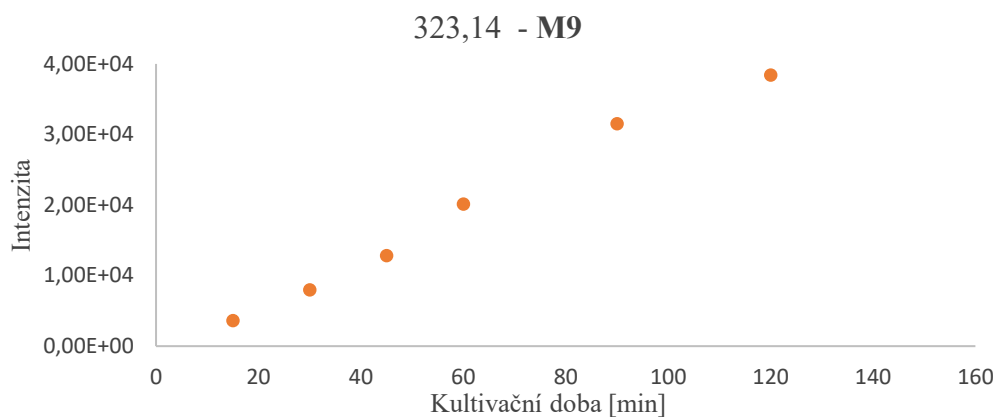
Nárůst intenzity odezvy v čase byl sledován u každého metabolitu. Pro vyhodnocení byla zvolena koncentrace 90 µM. Jako demonstrativní příklad je na Obr. 49 uveden graf nárůstu M1, ostatní metabolity vykazovaly velmi podobný profil nárůstu.



Obr. 49 Graf nárůstu intenzity metabolitu M1.

Velmi podobný nárůst intenzity metabolitů v čase byl pozorován i v případě dihydroxylovaných metabolitů, s rozdílem absolutní hodnoty intenzity, která byla o dva

řády nižší. Příklad nárůstu dihydroxylovaných metabolitu M9 v závislosti na čase je znázorněno na Obr. 50.

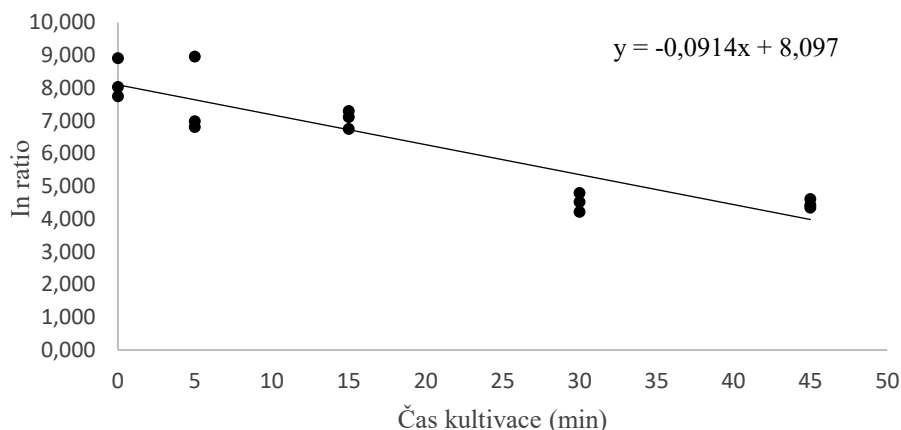


Obr. 50 Graf nárůstu intenzity metabolitu M9.

### 4.1.3 Mikrosomálně stabilitní studie

V dnešní době se pro odhad a predikci *in vivo* metabolismu nové chemické entity používají metody *in vitro*, které mají několik výhod. Nejprve umožňují stanovit metabolické vlastnosti v rané fázi vývoje nového léčiva. Dále jsme pomocí těchto studií schopni určit metabolickou stabilitu. Metabolická stabilita je vyjádřena jako poločas *in vitro* a vnitřní clearance. Na základě těchto hodnot můžeme předpokládat, jakou náchylnost bude k biotransformaci sloučenina vykazovat [72].

U experiment 4 jsme vycházeli ze stabilitní studie dle protokolu firmy Cyprotex [71]. Během mikrosomálně stabilitní studie se pracovalo s nižší koncentrací zásobního roztoku fenoxytakrinu (3  $\mu\text{M}$ ) a ke kvantifikaci se zvolila metoda vnitřního standardu. Z ploch pod píkem parentní látky a IS se vypočítal poměr, který byl následně zlogaritmován. Z hodnot zlogaritmovaných poměrů v čase 45 a 0 minut byl vypočítán procentuální úbytek parentní látky – po 45 minutách se zmetabolizovalo 45,84 % parentní látky. Ze závislosti zlogaritmovaného poměru ploch na kultivačním čase byl sestaven graf (Obr. 51), jehož součástí je i rovnice přímky.



Obr. 51 Graf závislosti poměru ploch pod píkem na inkubačním čase.

Z rovnice přímky (ze směrnice) byl vypočítán  $t_{1/2}$ , který byl stanoven na  $t_{1/2} = 7,58$  minut. Výpočet byl stanoven ze vzorce [71]:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k},$$

kde  $k$  odpovídá rychlostní konstantě eliminace, resp. záporné hodnotě směrnice přímky. Hodnota  $t_{1/2}$  byla využita pro výpočet intrinsic clearance vypovídající o vnitřní schopnosti jater odstranit léčivo. Hodnota clearance byla stanovena na  $Cl_{int} = 182,98$   $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  proteinu. K výpočtu bylo nejdříve zapotřebí dopočítat objem  $V$  [ $\mu\text{l}/\text{mg}$ ] pomocí vzorce:

$$V = \frac{\text{objem inkubované směsi } [\mu\text{l}]}{\text{protein v inkubaci } [\text{mg}]}.$$

Pro výpočet intrinsic clearance bylo  $t_{1/2}$  a spočítaný objem pouze dosazen do vzorce:

$$Cl_{int} = \frac{V \times 0,693}{t_{1/2}}.$$

Jako standard pro porovnání hodnot byl zvolen a naší metodou naměřen pomalu odbourávaný diazepam a jako standard pro rychlé odbourávání byl zvolen verapamil [71].

Tab. 9 Hodnoty biologického poločasu a intrinsic clearance standardů a 7-FEOTY.

	$t_{1/2}$ [min]	$Cl_{int}$ [ $\mu$ l/min/mg proteinu]
Diazepam	990	1,401
Verapamil	18,14	76,4
7-FEOTA	7,58	182,98

Z hodnot z Tab. 9 můžeme vyvodit, že 7-FEOTA má velmi krátký biologický poločas, tzn. za 7,58 minuty poklesne její koncentrace na polovinu. Tomu odpovídá i vysoká hodnota  $Cl_{int}$ , z níž může být následně predikována lidská clearance.

Závěrem k mikrosomálně stabilitní studii lze shrnout, že bylo na základě hodnot  $t_{1/2}$  a  $Cl_{int}$  prokázáno, že 7-FEOTA je sloučenina, která rychle podstupuje biotransformaci. Dále by se tedy dalo předpokládat, že dle našich dosavadních výsledků bude biologická dostupnost tohoto léčiva *in vivo* pravděpodobně nízká. Tyto vypočítané hodnoty mohou predikovat biotransformaci 7-FEOTY v lidském těle, nicméně je potřeba brát v úvahu, že *in vitro* mikrosomální biotransformace není totožná s lidskou *in vivo* biotransformací, proto může docházet k jistým odchylkám.

## 5 ZÁVĚR

Diplomová práce se zabývá *in vitro* metabolismem 7-fenoxytakrinu s hlavním cílem stanovit metabolity 7-FEOTY po inkubaci s mikrosomy. Bylo zjištěno, že z 7-fenoxytakrinu po biotransformaci vzniká 17 metabolitů. U všech těchto metabolitů I. fáze je předpokládána oxidační reakce za vzniku monohydroxylovaných a dihydroxylovaných metabolitů. Byly navrženy majoritní fragmenty těchto metabolitů, přesto se nepodařilo určit přesnou pozici hydroxylových skupin. Nicméně tyto fragmenty mohou být užitečné v dalších identifikačních studiích této látky.

Celý metabolický experiment byl stanovován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem. V průběhu studie byly několikrát upravovány parametry metody. Byla zkracována délka metody, byl upraven gradient, dále bylo zapotřebí snížit kolizní energii a v neposlední řadě se pracovalo s různými koncentracemi zásobních roztoků 7-FEOTY. Tyto úpravy vedly k optimalizaci podmínek experimentu a dosažení lepších výsledků.

V neposlední řadě byla provedena kvantifikační a mikrosomálně stabilitní studie. V rámci kvantifikační studie byl zjištěn úbytek parentní látky po 45 minutách o téměř polovinu své původní koncentrace, přesněji o 45,84 %. Dále byl sledován nárůst intenzity jednotlivých metabolitů. Součástí mikrosomálně stabilitní studie bylo za cíl stanovit biologický poločas a intrinsic clearance. Z těchto hodnot bylo usouzeno, že 7-fenoxytakrin je látka, která podléhá rychlé metabolizaci. Tyto hodnoty byly dále i porovnány se standardy diazepamem a verapamilem.

Na závěr lze dodat, že jednotlivé cíle diplomové práce byly částečně naplněny a bylo získáno mnoho nových experimentálních poznatků o doposud metabolicky nestudované látce. Práce tak přináší cenné informace pro další studium FEOTY.

## SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- [1] VERIKA, Vasic; BARTH, Katharin; SCHMIDT, Mirko H. H. Neurodegeneration and Neuro-Regeneration — Alzheimer's Disease and Stem Cell Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, **2019**, 20(17), 4272. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20174272>.
- [2] HOOPER, Nigel M. et al. *Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease: Methods and protocols*. Humana Press, Totowa, NJ 2000, str. 377–386, 395. ISBN 978-1-59259-195-4.
- [3] ZAGÓRSKA, Agnieszka; JAROMIN, Anna; MALAWSKA, Barbara. Perspectives for New and More Efficient Multifunctional Ligands for Alzheimer's Disease Therapy. *Molecules*, **2020**, 25(15), 3337. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules25153337>.
- [4] GIREK, M.; SZYMANSKY, P. Tacrine hybrids as multi-target-directed ligands in Alzheimer's disease: influence of chemical structures on biological activities. *Chem. Pap.*, **2019**, 73, 269–289. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11696-018-0590-8>.
- [5] *Výroční zpráva* [on-line], [cit. 2021-04-08]. Česká alzheimerovská společnost, 2019. URL: <http://www.alzheimer.cz/cals/vyrocní-zpravy/>.
- [6] *Adopting a healthy lifestyle helps reduce the risk of demetia* [on-line], [cit. 2021-04-08]. World Health Organisation, 2019. URL: <https://www.who.int/news/item/14-05-2019-adopting-a-healthy-lifestyle-helps-reduce-the-risk-of-dementia>.
- [7] KORABEČNÝ, Jan et al. 7-Methoxytacrine-p-Anisidine Hybrids as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Molecules*, **2015**, 20(12), 22084–22101. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.3390/molecules201219836>.
- [8] FAKHOURY, Marc. Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy. *Curr. Neuropharmacol.*, **2018**, 16(5), 508–518. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170720095240>.
- [9] VYKLIČKY, V. et al. Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels. *Physiol. Res.*, **2014**, 63(1), 191–203. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.33549/physiolres.932678>.
- [10] SAMEEM, Bilqees et al. A review on tacrine-based scaffolds as multi-target drugs (MTDLs) for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 128, 332–345. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.060>.
- [11] PATOČKA, Jiří. Possible Role of Hydroxylated Metabolites of Tacrine in Drug Toxicity



- and therapy of Alzheimer's Disease. *Curr. Drug Metab.*, **2008**, *9*(4), 332–335. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/138920008784220619>. PMID: 18473751.
- [12] LOU, Yan-Hong et al. The acute hepatotoxicity of tacrine explained by 1H NMR based metabolomic profiling. *Toxicol. Res.*, **2015**, *4*, 1465–1478. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/c5tx00096c>.
- [13] MADDEN, Stephen et al. Clinical Pharmacokinetics of Tacrine. *Clin. Pharmacokinet.*, **1995**, *28*(6), 449–457. Dostupné z: <https://doi.org/10.2165/00003088-199528060-00003>.
- [14] MESITI, Francesco et al. The chemistry toolbox of multitarget-directed ligands for Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.*, **2019**, *181*, article 111572. Dostupné z: [doi: https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111572](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111572).
- [15] JARROTT, Bevyn. Tacrine: In vivo veritas. *Pharmacol. Res.*, **2017**, *116*, 29–31. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.033>. Epub 2016 Dec 28.
- [16] KANIAKOVA, Martina et al. 7-phenoxytacrine is a dually acting drug with neuroprotective efficacy in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, **2021**, *186*, article 114460. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114460>.
- [17] ZDRAVOVA KARASOVA, Jana et al. Tacrine and its 7-methoxy derivate; time-change concentration in plasma and brain tissue and basic toxicological profile in rats. *Drug Chem. Toxicol.*, **2021**, *44*(2), 207–214. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1566350>.
- [18] SKÁLOVÁ, Lenka; BOUŠOVÁ, Iva. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1917-0.
- [19] MCQUEEN, Charlene A. (Edt.) *Comprehensive toxicology* [on-line]. 2nd. Elsevier, Auburn University, USA 2010. ISBN 978-0-08-046868-6.
- [20] GUENGERICH, Peter F. Cytochrome P450 and Chemical Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, *21*(1), 70–83. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/tx700079z>.
- [21] ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVÁ, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2001**, *58*(5-6), 737–747. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/PL00000897>.
- [22] COLEMAN, Michael. *Human Drug Metabolism: An Introduction*. 2<sup>nd</sup> Ed., John Wiley & sons, Aston University, Birmingham 2005. ISBN 0-470-86352-8.
- [23] SCHNEIDER, Elizabeth a Douglas S. CLARK. Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the

- development of CYP biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, **2013**, 39(1), 1–13. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.05.043>.
- [24] STIBOROVÁ, Marie et al. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy*, **1999**, 93, 229–237.
- [25] ULRICH, Zanger M.; SCHWAB, Matthias. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol. Ther.*, **2013**, 138(1), 103–141. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>.
- [26] INGELMAN-SUNDBERG, Magnus et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.*, **2007**, 116(3), 496–526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>.
- [27] RÁCZ, Anita; KESERŰ, György M. Large-scale evaluation of cytochrome P450 2C9 mediated drug interaction potential with machine learning-based consensus modeling. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **2020**, 34, 831–839. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10822-020-00308-y>.
- [28] IOANNIDES, Costas. *Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics*. John Wiley & sons, Guildford, UK, 2001. ISBN 0-471-894-66-4.
- [29] RAJ, Gerard Marshall; RAVEENDRAN, Ramasamy. *Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology: Volume 1: General and Molecular Pharmacology: Principles of Drug Action*. Springer Nature, Singapore, 2019. ISBN 978-981-32-9778-4.
- [30] EVANS, Gary. *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*. CRC Press, USA, 2004. ISBN 0-415-27519-9.
- [31] GE, Shufan et al. Challenges and Opportunities with Predicting In Vivo Phase II Metabolism via Glucuronidation From In Vitro Data. *Curr. Pharmacol.*, **2016**, 2, 326–338. <https://doi.org/10.1007/s40495-016-0076-8>.
- [32] PEARSON, Paul G.; WIENKERS, Larry C. *Handbook of Drug Metabolism* [online]. 2<sup>nd</sup> Ed., CRC Press, New York, USA 2008. ISBN 10: 1-4200-7647-7.
- [33] KUMAR, Yogesh; MUMTAZ, Sayed Md; AHMAD, Mustaq. HPLC: Principle and Maintenance with Application. *Int. J. Trend Sci. Res. Dev.* **2018**, 2(5). 1618–1626. Dostupné z: <https://doi.org/10.31142/ijtsrd17134>.
- [34] SNYDER, Lloyd R. et al. *Introduction to modern liquid chromatography*. 3<sup>rd</sup> Ed., John

- Wiley & sons, New York, USA 2009. ISBN 978-0-470-16754-0.
- [35] AKRAM, N. MD.; UMAMAHESH, M. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J. Res. Appl. Sci. Eng. Tech*, **2018**, 6(2), 487–492. Dostupné z: DOI: <https://doi.org/10.22214/ijraset.2018.2098>.
- [36] NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd., Europrint, Praha 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [37] CHAWLA, Gita; CHAUDHARY, Krishna Kr. A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications. *Int J Pharm Chem Anal.*, **2019**, 6(2), 27–39. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.18231/j.ijpca.2019.006>.
- [38] *Teorie HPLC* [online], [cit. 2020-12-09]. URL: <http://www.hplc.cz/Teorie/>.
- [39] DOLAN, John. D. *Mobile-phase Degassing: What, Why and How*. [on-line], [cit. 2021-01-12]. URL: <https://www.chromatographyonline.com/view/mobile-phase-degassing-what-why-and-how>.
- [40] ŽUVELA, Petar et al. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Rev.*, **2019**, 119(6), 3674–3729. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00246>.
- [41] SCOTT, Raymond P.W. *Chromatographic Detectors. Design, Function and Operation*, Marcel Dekker, INC., New York 1996. ISBN: 0-8247-9779-5.
- [42] SWARTZ, Michael. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW, *J. Liq. Chromatog. Relat. Technol*, **2010**, 33, 1130-1150. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>.
- [43] MISRA, Gauri. *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*. Academic press, New Delhi, India 2019. ISBN: 978-0-12-816548-5.
- [44] *Mass spektrometry – A textbook*. [on-line], [cit. 2021-01-26]. URL: <http://ms-textbook.com/chapter-1/problem-1-2/>.
- [45] GROSS, J.H.; STROOBANT, Vincent. *Mass spectrometry: A textbook*. 3<sup>rd</sup> Ed., Springer International Publishing 2017. ISBN 978-3-319-54398-7.
- [46] ZHANG, Xing-Lei et al. Advances in Ambient Ionization for Mass Spectrometry. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(11), 1703-1713. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(18\)61122-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(18)61122-3).
- [47] ŚWIDER, Paweł et al. Comparison of the sensitivity of mass spectrometry atmospheric pressure ionization techniques in the analysis of porphyrinoids. *J. Mass Spectrom.*,

- 2013**, 48(10), 1116-1124. Dostupné z: <https://doi.org/doi:10.1002/jms.3261>.
- [48] PARR, Maria Kristina et al. Splitless hyphenation of SFC with MS by APCI, APPI, and ESI exemplified by steroids as model compounds. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **2018**, 1091, 67–78. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.05.017>.
- [49] KONERMANN, Lars et. al. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. *Anal. Chem.*, **2013**, 85(1), 2–9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac302789c>.
- [50] LI, Du-Xin et. al. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Anal. Chim. Acta*, **2015**, 891, 43–61. Dostupné z: doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.08.002>.
- [51] ROBB, Damon B. et al Atmospheric Pressure Photoionization: An Ionization Method for Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 3653-3659. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ac0001636>.
- [52] HOU, Tsung-Yun et al. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J. Food Drug Anal.*, **2019**, 27(2), 404-414. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>.
- [53] WU, Chunping et al. Mass spectrometry imaging under ambient conditions. *Mass Spectrom. Rev.*, **2013**, 32(3), 218–243. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mas.21360>.
- [54] PAVLOVICH, Matthew J. et al. Direct analysis in real time - Mass Spectrometry (DART-MS) in Forensic and Security Applications. *Mass Spectrom. Rev.* **2018**, 37, 171-187. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mas.21509>.
- [55] VOLNÝ, Michael. Hmotnostní analyzátor doby letu. *Chem. Listy*, **2020**, 114, 113–118.
- [56] Obrázek kvadrupólu: <http://life.nthu.edu.tw/~labcejw/BioPhyChem/Mass/quadrupo.htm>.
- [57] MARCH, Raymond E. An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 351–369. Dostupné z: [https://doi/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199704\)32:4%3C351::AID-JMS512%3E3.0.CO;2-Y](https://doi/10.1002/(SICI)1096-9888(199704)32:4%3C351::AID-JMS512%3E3.0.CO;2-Y).
- [58] *A quadrupole ion trap* [on-line] [cit. 2021-02-18] URL: <https://aquadrupauliontrap.wordpress.com/types-of-ion-traps/>.
- [59] HAGER, James W. A new linear ion trap mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2002**, 16(6), 512–526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/rcm.607>.
- [60] ELIUK, Shannon; MAKAROV, Alexander. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. *Anual Rev. Anal. Chem.*, **2015**, 8, 61-80. Dostupné z:

- <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040325>.
- [61] HECHT, E. S. et al. Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry. *In Encyclopedia of Analytical Chemistry*, **2019**, 1–40. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9309.pub2>.
- [62] ŽABKA, Jan. Orbitálna past': Hmotnostný analyzátor s vysokým rozlíšením. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická: 21. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, 15.9.2020, [35].
- [63] NOVÁK, Petr. Iontová cyklotronová rezonance. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická: 21. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, 15.9.2020, 30.
- [64] *Electron Multipliers for Mass Spectrometry* [online]. RESTEK [cit. 2021-03-02]. Dostupné z: <https://m.restek.com/pdfs/GNBR1000A-UNV.pdf>.
- [65] *Tandem Mass Spectrometry* [online], [cit. 2021-04-17]. Dostupné z: <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/tandem-ms>.
- [66] Obrázek trojitého kvadrupólu: *Mass spectrometry* [online], [cit. 2021-03-02]. URL: [http://www.biologie.hu-berlin.de/gruppenseiten/oekologie/meth/massspec/mass\\_sp](http://www.biologie.hu-berlin.de/gruppenseiten/oekologie/meth/massspec/mass_sp).
- [67] KAUFMANN, Anton. Analytical performance of the various acquisition modes in Orbitrap MS and MS/MS. *J. Mass Spectrom.*, **2018**, 53, 725–738. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jms.4195>.
- [68] PLAČEK, Lukáš. Skenovací módy s orbitální iontovou pastí. Špindlerův mlýn: 20. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, 20.9.2019.
- [69] RapidStart [online], [cit. 2021-6-30]. SEKISUI XenoTech, 2021. Dostupné z: [https://www.xenotech.com/wp-content/uploads/2021/01/K5000\\_211001.pdf](https://www.xenotech.com/wp-content/uploads/2021/01/K5000_211001.pdf).
- [70] NEPOVIMOVÁ et al. Tacrine – Trolox hybrids: A novel class of centrally active, nonhepatotoxic multi-target-directed ligands exerting anticholinesterase and antioxidant activities with low in vivo toxicity. *J. Med. Chem.* **2015**; 58; 8985–9003. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01325>.
- [71] *Microsomal stability assay protocol* [online], [cit. 2021-6-30]. Cyprotex, 2021. Dostupné z: <https://www.cyprotex.com/admepk/in-vitro-metabolism/microsomal-stability>.
- [72] BARANCZEWSK, Pawel et al. Introduction to in vitro estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol. Rep.*, **2006**, 58, 453–47. PMID: 16963792.

# SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

ACN	Acetonitril
AD	Alzheimer disease
AGC	Kontrola automatického zisku
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesteráza
ALD	Alkoholdehydrogenáza
ALT	Alaninaminotransferáza
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
API	Atmospheric pressure ionization
APP	Amyloid precursor protein
APPI	Atmospheric pressure photoionization
AST	Aspartataminotransferáza
ATP	Adenosintrifosfát
A $\beta$	$\beta$ -amyloid
A $\beta$ <sub>1-40</sub>	$\beta$ -amyloid izoforma 1–40
BACE-1	Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1
BChE	Butyrylcholinesteráza
CI	Chemical ionization
CNS	Centrální nervová soustava
CPR	Cytochrom P450 reduktáza
CYP450	Cytochrom P450

CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
DAO	Diamino oxidáza
DART	Direct Analysis in Real Time
DESI	Desorption Electrospray Ionization
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EI	Electron ionization
EIC	Extrahovaný iontový chromatogram
ER	Endoplazmatické retikulum
ESI	Electrospray Ionization
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDA	Food and Drug Administration
FMO	Flavin-containing monooxygenase
FT-ICR	Fourier-transform Ion cyclotron resonance
GC	Gas chromatography
GSH	Glutathion
HCD	Higher-energy collisional Dissociation
HESI	Heated Electrospray Ionization
HLM	Human liver microsomes
HPLC	High performance liquid chromatography
HEB	Hematoencefalická bariéra
IL-1	Interleukin-1
IS	Vnitřní standard
i.v.	intra-venous (injekčně)
LC	Liquid chromatography

LC-MS	Liquid chromatography-Mass spectrometry
LIT	Linear ion trap
MALDI	Matrix-Associated Laser Desorption/Ionization
MAO	Monoamineoxidase
MF	Mobilní fáze
MS	Mass spektrometry
NAT	N-acetyltransferase
NCE	Normalizovaná kolizní energie
MTDLs	Multi-target directed ligands
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	Redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartat
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NPC	Normal phase chromatography
p.o.	perorální
PRM	Parallel Reaction Monitoring
QIT	Quadrupole ion trap
QQQ	Triple Quadrupole
ROS	Reactive Oxygen Species
RPC	Reverse phase chromatography
SER	Smooth endoplasmatic reticulum
TGáza	Transglutamináza
TIC	Celkový záznam iontů (Total Ion Current)
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor- $\alpha$
TOF	Time-of-flight



UDP	Uridin-5'-difosfát
UDPGA	Uridin-5'-difosfát- $\alpha$ -D-glukuronová kyselina
UGT	Uridin-5'-difosfo(UDP)-glucuronosyltransferáza
UV	Ultraviolet
WHO	World Health Organisation
XO	Xantinoxidáza
2D	Dvourozměrný
3D	Třírozměrný
7-FEOTA	7-fenoxytakrin
7-MEOTA	7-methoxytakrin