

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY

Disertační práce:

**Využití HPLC-HRMS pro studium látek ze skupiny takrinu
potenciálně využitelných v terapii Alzheimerovy choroby**

(Soubor publikovaných prací doplněných komentářem)

Kandidát: Mgr. Martin Novák

Školitel: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Konzultant: doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Prohlášení

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

V Hradci Králové dne 28. 8. 2023

.....
Mgr. Martin Novák

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému školiteli doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za jeho cenné rady, předané zkušenosti, ochotu, trpělivost a odborné vedení po celou dobu mého studia. Zvláštní poděkování patří i prof. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D. za jeho odborné vedení a za poskytnutí příležitosti zapojit se do výzkumné práce v rámci Centra Biomedicínského Výzkumu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové. Dále děkuji svému konzultantovi doc. Mgr. et Mgr. Rafaelu Doležalovi, Ph.D. za uvedení do problematiky vývoje léčiv v terapii Alzheimerovy nemoci.

Velké poděkování patří také všem spoluautorům předložených publikací za jejich výzkumnou spolupráci, především týmům doc. Korábečného, prof. Soukupa a prof. Lauschkeho. Můj vděk patří i všem kolegům z Katedry Farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, a také z Centra Biomedicínského Výzkumu, především Mgr. Ondřeji Horáčkovi, PharmDr. Lukáši Prchalovi, Ph.D. a Mgr. Michaele Hympánové za vytvoření přátelského a příjemného pracovního prostředí.

Dále bych rád poděkoval své rodině, svým dětem Kryštofovi a Lauře a rodičům Jaromírovi a Martě. V neposlední řadě patří obrovské poděkování mojí manželce PharmDr. Lucii Novákové nejen za její trpělivost a psychickou podporu v nepříznivých obdobích doktorského studia ale vlastně za za vše!

Práce byla finančně podpořena projekty SVV 260 547 a SVV 260 666 a projektem GAČR (no. 20-12047S a 23-07570S).

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické Chemie a Farmaceutické Analýzy

Kandidát: Mgr. Martin Novák

Konzultant: doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Školitel: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Název: Využití HPLC-HRMS pro studium látek ze skupiny takrinu potenciálně využitelných v terapii Alzheimerovy choroby.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie ve spojení s vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií (HPLC-HRMS) je analytickou technikou, která je velmi často využívána při vývoji nových léčiv. Široké uplatnění tato technika nalézá od potvrzení navrhované struktury a identifikace přítomných nečistot, přes hodnocení absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece až po monitorování otrav a intoxikací.

Předkládaná disertační práce se v teoretické části zaměřuje na základní charakteristiku Alzheimerovy nemoci, její aktuálně dostupnou terapii a na nové strategie léčby. Dále je zde věnována pozornost i oblastem úzce spojeným s experimentální částí a to: studiu farmakokinetiky, analytickým nástrojům pro stanovení farmakokinetických parametrů, kapalinové chromatografii, hmotnostní spektrometrii a specifikům bioanalytických metod.

Experimentální práce je komentářem ke čtyřem publikovaným pracím zabývajících se tematikou vývoje a preklinického hodnocení látek ze skupiny takrinu, které jsou nadějnými kandidáty pro léčbu Alzheimerovy nemoci. Práce je primárně zaměřena na studium absorpce a metabolizace molekul takrinu, 7-methoxytakrinu a jeho derivátů, 6-chlortakrinu a 7-fenoxytakrinu. Jelikož takrin je molekulou, která byla stažena z klinického užívání z důvodu zjištěných hepatotoxických účinků jeho metabolitu 7-hydroxytakrinu, je nezbytné z pohledu bezpečnosti farmakoterapie hepatotoxicitu sledovat i u nově vyvíjených takrinových derivátů. Jedním z hlavních cílů práce bylo vyvinout a optimalizovat HPLC-MS metodu, která umožní komplexně monitorovat biotransformaci molekul takrinu, 7-methoxytakrinu, 7-fenoxytakrinu a 6-chlortakrinu. Díky aplikaci nově vyvinuté vysoce selektivní HPLC-HRMS metody bylo stanoveno, že

7-fenoxytakrin tvoří po inkubaci s lidskými jaterními mikrosomy pouze stopové množství 7-hydroxytakrinu a že 6-chlortakrin tento prekurzor toxického působení netvoří vůbec. Dále je v práci věnována pozornost analytickému ověření identity a hodnocení nečistot u nově syntetizovaných látek, studiu jejich schopnosti prostupu přes hematoencefalickou bariéru a pokročilejšímu studiu biotransformace a toxicity vybraných takrinových derivátů. Výsledky této disertační práce poskytují informace, které přispívají k racionálnímu vývoji nových takrinových derivátů se sníženou, případně nevyskytující se hepatotoxicitou.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Mgr. Martin Novák

Supervisor - specialist: doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Supervisor: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Title: Use of HPLC-HRMS for the study of tacrine group compounds potentially useful in the therapy of Alzheimer's disease.

High-performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS) is an analytical technique very often used in the new drugs development. This technique is widely used, from the confirmation of the proposed structure and identification of present impurities, through the assessment of absorption, distribution, metabolism and excretion to the monitoring of poisoning and intoxications.

In the theoretical part, the presented dissertation thesis is focused on the basic characteristics of Alzheimer's disease, its currently available treatment and new treatment strategies. In addition, attention is paid to areas closely related to the experimental part, namely: the study of pharmacokinetics, analytical tools for determining pharmacokinetic parameters, liquid chromatography, mass spectrometry and the specifics of the bioanalytical methods.

The experimental work is in the commented form of four published works dealing with the development and preclinical evaluation of substances from the tacrine group, which are promising candidates for the treatment of Alzheimer's disease. The work is primarily focused on studying of absorption and biotransformation of tacrine molecules, 7-methoxytacrine and its derivatives, 6-chlorotacrine and 7-phenoxytacrine. Since tacrine is a molecule that has been withdrawn from clinical use due to the established hepatotoxic effects of its 7-hydroxytacrine metabolite, it is necessary from the point of view of the safety of pharmacotherapy to monitor hepatotoxicity in newly developed tacrine derivatives as well.

One of the main objectives of the work was to develop and optimize the HPLC-MS method, which will enable comprehensive monitoring of the biotransformation of

tacrine, 7-methoxytacrine, 7-phenoxytacrine and 6-chlorotacrine molecules. Thanks to the application of a newly developed highly selective HPLC-HRMS method, it was determined that 7-phenoxytacrine forms only a trace amount of 7-hydroxytacrine after incubation with human liver microsomes and that 6-chlorotacrine does not form this metabolic precursor of toxic action at all. Furthermore, the work pays attention to the analytical confirmation of the identity and the determination of impurities of the newly synthesized substances, the study of their ability to pass through the blood-brain barrier, and a more advanced study of the biotransformation and toxicity of selected tacrine derivatives. The results of this dissertation thesis provide the data that contribute to the rational development of new tacrine derivatives with reduced or no hepatotoxicity.

Seznam použitých zkratek

AchE	Acetylcholinesterasa
ADME	Absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece
ADMET	Absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece, toxicita
ALT	Alanin-amino-transferasa
AN	Alzheimerova nemoc
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Atmosférická fotoionizace
ApoE	Apolipoprotein E
AST	Aspartát-amino-transferasa
C18	Osmnácti uhlíkatý řetězec
C8	Osmi uhlíkatý řetězec
CDK5	Cyklin dependentní kináza 5
CNS	Centrální nervová soustava
DILI	Lékové postižení jater
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HLM	Lidské jaterní mikrosomy
HPLC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
MALDI	Laserem asistovaná ionizace a desorpce
MDCK	Madin - Darby Canine Kidney
MF	Mobilní fáze
NMDA	N-methyl-d-aspartát
PP2A	Protein fosfaasa A2
QqQ	Trojité kvadrupól
q-TOF	Kvadrupól-detektor doby letu
SF	Stacionární fáze
SLP	Správná laboratorní praxe
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
7-Meota	7-Methoxytakrin
7-Feota	7-Fenoxytakrin

Obsah

PODĚKOVÁNÍ	3
ABSTRAKT.....	4
ABSTRACT.....	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1 ÚVOD.....	11
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 Alzheimerova nemoc.....	13
2.1.1 První diagnóza a klinické projevy	13
2.1.2 Incidence a predikce.....	14
2.1.3 Etiopatogeneze.....	14
2.1.4 Patofyziologie onemocnění.....	15
2.2 Léčba Alzheimerovy nemoci	16
2.2.1 Současná farmakoterapie.....	17
2.2.2 Vývojové směry nových terapeutických skupin pro léčbu Alzheimerovy nemoci	20
2.3 ADME studie.....	24
2.3.1 Absorpce.....	25
2.3.2 Distribuce.....	25
2.3.3 Metabolismus	26
2.3.4 Exkrece	28
2.4 Analytické nástroje pro stanovení farmakokinetických parametrů	28
2.4.1 Chromatografie	28
2.4.2 Hmotnostní spektrometrie.....	34
2.5. Specifika analýzy biologického materiálu	41
2.5.1 Úprava vzorku před analýzou.....	42
2.5.2 Instrumentace	42
3 CÍLE PRÁCE	44
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - komentář k publikovaným pracím	45
4.1 Úvod do problematiky takrinové toxicity	45
4.2 Nadějně deriváty takrinu a 7-methoxytakrinu.....	45
4.3 Charakteristika molekuly 7-fenoxytakrinu.....	48
4.4 Hodnocení biotransformace takrinu a jeho vybraných derivátů.....	50
4.5 Studium toxicity takrinu a jeho vybraných derivátů	54
5 ZÁVĚR.....	57
6 SEZNAM PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI	59

7 DALŠÍ AUTORSKÉ PUBLIKACE NEZAHNUTÉ DO DISERTAČNÍ PRÁCE.....	60
8 PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONFERENCÍCH.....	61
9 ÚČAST V GRANTECH.....	62
10 STÁŽE A DALŠÍ ODBORNÉ ZKUŠENOSTI	62
11 REFERENCE.....	63
PŘÍLOHY	74

1 ÚVOD

Alzheimerova nemoc (AN) byla již před více než sto lety poprvé popsána německým psychiatrem a neurologem Aloisem Alzheimerem u pacientky, která trpěla poruchami spánku, paranoidními představami a výpadky paměti. Jedná se o nejčastěji vyskytující se neurodegenerativní onemocnění centrálního nervového systému v lidské populaci a mezi jeho primárně sledované projevy v současnosti patří poruchy mozkových funkcí, ztráta paměti a sebekontroly, demence, halucinace a častá motorická selhání. ^[1,2] Vzhledem k dostupným statistickým údajům Světové zdravotnické organizace (WHO, World Health Organization), které uvádí, že onemocnění je pátou nejčastější příčinou smrti, že každé 3,2 vteřiny je stanovena nová diagnóza a že onemocnění může komplikovat život pacientům po několik desetiletí, lze toto onemocnění zařadit mezi jeden z nejzávažnějších medicínských problémů v současné populaci. Péče o pacienty s tímto typem demence zapříčiňuje rovněž velikou časovou, psychickou a ekonomickou zátěž jednotlivých rodin nebo pečovatelských zařízení a neopominutelnou nákladovou položku pro jednotlivé zdravotnické systémy. ^[3,4]

Současná léčba je v ČR zaměřena na dvě terapeutické skupiny (inhibitory acetylcholinesterasy a blokátory *N*-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů). Je důležité zmínit, že všechna 4 registrovaná léčiva v ČR (donepezil, rivastigmin, galantamin a memantin) působí v terapii pouze symptomaticky. Hlavním důvodem dlouhodobě chybějící efektivní léčby, která by dokázala zvrátit průběh tohoto onemocnění, je stále nedokonale objasněná etiologie a patofyziologie Alzheimerovy nemoci. ^[5,6]

Aktuální zaměření vývoje nových látek pro terapii AN lze rozdělit na dvě oblasti. První oblastí je vývoj kauzálně působících látek, kde se prozatím nepodařilo žádné nové látky úspěšně absolvovat třetí fázi klinického hodnocení. Druhou oblastí je vývoj, případně optimalizace, látek působících symptomaticky, jako je tomu například u skupiny takrinových derivátů.

Analytické separační metody mají svoji nezastupitelnou roli téměř ve všech fázích vývoje nových léčiv. Zvláště důležitá je tato oblast při stanovování a interpretaci farmakokinetických, farmakodynamických a toxických vlastností nově vyvíjených účinných látek.

V teoretické části se práce věnuje tematicce AN, její léčbě, stanovovaným farmakokinetickým a farmakodynamickým vlastnostem nově vyvíjených léčiv

a specifikům analýzy biologického materiálu primárně za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HPLC-HRMS).

Experimentální část práce je souborem čtyř publikovaných prací doplněných komentářem. Hlavním nosným tématem všech uvedených publikací je problematika vývoje nových léčiv potenciálně uplatnitelných v terapii AN. Komentář je primárně zaměřen na vývoj, optimalizaci a aplikaci HPLC-HRMS pro hodnocení farmakokinetických a farmakodynamických vlastností látek vycházejících se struktury takrinu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Alzheimerova nemoc

2.1.1 První diagnóza a klinické projevy

Alzheimerova nemoc (AN) byla poprvé popsána německým psychiatrem a neurologem Aloisem Alzheimerem na případu pacientky Johany Augusty Caroline Deterové. ^[1] Pacientka, která trpěla závažnými poruchami spánku, paranoidními představami a výpadky paměti, byla v listopadu roku 1901 přivezena a hospitalizována na psychiatrické klinice ve Frankfurtu nad Mohanem, kde byla svěřena do péče Dr. Aloisi Alzheimerovi. ^[7] Alzheimer se během její hospitalizace velmi intenzivně věnoval dokumentaci zdravotního stavu, ptal se jí na mnoho otázek a nechal ji podstoupit řadu různých vyšetření. Cílem jeho sledování byla snaha o rozluštění a popsání příčiny jejích závažných zdravotních komplikací. Náklady na hospitalizaci a na různá vyšetření se postupem času staly pro Augustinina manžela Carla finančně neúnosné, a proto se rozhodl podepsat Dr. Alzheimerovi souhlas, že jeho péče o manželku bude na klinice pokračovat bez dalších nákladů výměnou za její mozek a lékařské záznamy po smrti. ^[8] Během posmrtné histologické autopsie pacientčina mozku v roce 1906 našel Dr. Alzheimer v mozkové tkáni výrazné plaky a neurofibrilární klubka. Klinické záznamy onemocnění, které nazval jako „dementia preacox“, zveřejnil Alzheimer poprvé v Tübingenu na 37th Meeting of South-West German Psychiatrist v roce 1906. ^[7,9] Později bylo označení „dementia preacox“ přejmenováno jeho studentem profesorem Emilem Kraepelinem na Alzheimerovu nemoc. ^[8]

První diagnostická kritéria byla pro AN stanovena v roce 1984, avšak definitivní diagnóza mohla být v té době stanovena až z posmrtné pitvy mozku. V současnosti je AN charakterizována jako progresivní neurodegenerativní onemocnění, které vede k duševnímu a fyzickému úpadku s následnou smrtí pacienta. Jedná se o neléčitelnou nemoc, kdy její průběh a progrese prozatím nelze zastavit, lze pouze o měsíce (v některých případech i o roky) zpomalit. Pokročilejší fáze tohoto onemocnění bývá označována jako Alzheimerova demence (z latinského *de mens* = mimo mysl). Demence je stav, kdy v důsledku chorobného procesu dochází ke snížení kognitivních funkcí oproti předchozímu stavu. ^[2]

Mezi první vyskytující se duševní příznaky AN patří různé kognitivní dysfunkce, jako jsou například poruchy krátkodobé paměti, učení a počítání. U lidí trpících tímto onemocněním se dále postupně objevuje neadekvátní chování, ztráta emocionální kontroly, neschopnost komunikovat s okolím a problémy s jednoduchými úkony (oblékání se, osobní hygiena, ...).^[2] Pacienti postupem času ztrácejí orientaci v prostoru, přestávají chápat, co jim kdo říká, nepoznávají své blízké a mohou se dostat až do fáze, kdy přestanou úplně reagovat na vnější podněty a jsou zcela závislí na ošetřujícím personálu.^[10]

2.1.2 Incidence a predikce

V roce 2022 byly celosvětově různé formy demence diagnostikovány u více než 55 milionů pacientů. Dle Světové zdravotnické organizace byl v tomto roce počet pacientů trpících Alzheimerovou chorobou odhadován na více než 35 milionů a na základě predikce by se do roku 2050 mohl jejich počet až ztrojnásobit a přesáhnout tak počet 100 milionů. V této predikci je zohledněn i postupně se zvyšující věk populace a budoucí zvýšená prevalence v rozvojových zemích, kde žije v současnosti poměrně mladá populace. Již po dobu několika let je každoročně dokumentováno okolo deseti milionů nových případů za rok. To znamená, že každé 3,2 vteřiny je stanovena nová diagnóza AN.^[2-4]

2.1.3 Etiopatogeneze

Z dosavadních znalostí plyne, že AN je komplikovaným multifaktoriálním onemocněním a příčina nemoci stále nebyla dostatečně objasněna. Její etiopatogeneze je předmětem usilovného zkoumání mnoha vědeckých skupin na celém světě.^[11]

Mezi nejčastěji popisované odchylky patří výskyt amyloidních plaků a shluků tvořených tau proteinem v mozkové tkáni. Amyloidní plaky jsou extracelulární depozita tvořená fragmenty β -amyloidu o délce 40-42 aminokyselin, které v mozku koagulují a polymerují a vytváří tak plaky způsobující odumírání neuronů.^[12] Závažnost klinického stavu pacienta velmi dobře koreluje s nalezenou koncentrací β -amyloidu.^[13] Rizikovým faktorem vzniku AN je rovněž zvýšený výskyt apolipoproteinu E (ApoE).^[2] U homozygotů s alelami pro ApoE4 je riziko výskytu AN o 74% vyšší než u lidí bez výskytu těchto alel.

Vazba ApoE na amyloid β způsobuje strukturální změny amyloidu β , čímž následně zvyšuje jeho toxické působení v neuritických placích. ^[10,14] Dalšími zásadními depozity proteinů vyskytujícími se u AN jsou intracelulárně tvořené shluky tau proteinu. Z tau proteinu jsou odštěpovány krajní aminokyseliny a zbytek jeho peptidového řetězce je následně hyperfosforylován. To vede k tvorbě neurofibrilárních klubek, která narušují uspořádání a funkci buňky a mohou způsobit až její smrt. Hyperfosforylace tau proteinu je způsobena glykogen-syntasou kinasou 3β . ^[15]

Další vyskytující se abnormalitou je excitotoxicky působící glutamát v kombinaci s oxidačním stresem, ^[16] způsobující zvýšený vstup kalcia do neuronů, který vede k následnému spuštění apoptózy buněk. ^[17] Na vzniku AN se rovněž mohou podílet další genetické faktory (mutace na chromozomu 1 a 14 v oblastech kódující preseniliny vedoucí k tvorbě amyloidu β) nebo narušená produkce acetylcholinu. Mezi rizikové faktory patří vyšší věk, rodinný výskyt, špatná životospráva a obezita. ^[10]

2.1.4 Patofyziologie onemocnění

V současné době existuje vzhledem k neobjasněné etiologii a komplexnosti onemocnění několik teorií vzniku AN, které se v určitých bodech propojují nebo se vzájemně kombinují. ^[11]

První a nejčastěji popisovanou teorií vzniku je „klasická“ cholinergní teorie vzniku, která je založena na klíčové úloze neuromediátoru acetylcholinu v kognitivních funkcích člověka. U pacientů s diagnostikovanou AN je velmi často popisována snížená funkce enzymu acetylcholintransferasy, který se podílí na syntéze acetylcholinu. Snížená aktivita tohoto enzymu vede ke sníženému přenosu acetylu z acetyl-CoA na cholin, a tedy k neefektivní tvorbě acetylcholinu. Nedostatek tohoto neuromediátoru poté způsobuje sníženou cholinergní transmissi. Neefektivní transmise však může být způsobena nejen sníženou koncentrací acetylcholinu v synaptické štěrbině, ale rovněž poklesem příjmu signálu a jeho nedostatečnou amplifikací, ke které dochází na muskarinových a nikotinových receptorech. V případě muskarinových receptorů je patologická funkce dána sníženým přenosem signálu uvnitř buňky, zatímco u nikotinových receptorů byl pozorován jejich snížený počet. ^[18,19]

Amyloidní hypotéza je druhou obecně přijímanou teorií vzniku AN. Dle této hypotézy dochází v mozku k postupnému hromadění extracelulárních plaků amyloidu β ,

kteře hrají dle řady studií klíčovou roli v nástupu a progresi neudegenerativních onemocnění. Avšak jejich přesný mechanismus působení nebyl prozatím dostatečně objasněn. Nejpravděpodobnější je tvorba toxických fragmentů amyloidu β z amyloidního prekurzorového proteinu pomocí enzymu β -sekretasy za vzniku C-terminálního fragmentu o délce 99 aminokyselin. Tento fragment je následně štěpen γ -sekretasou na toxický amyloid β (peptidy o délce 38-43 aminokyselin). [20–22]

Dalším popsaným patologickým mechanismem je nadměrné uvolňování glutamátu, které vede k zvýšené aktivaci glutamátových receptorů (především receptorů kyseliny α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionové a N-methyl-D-aspartátových receptorů). Důsledkem zvýšené aktivace je usnadněný vstup vápenatých iontů do nervových buněk a nastartování programované buněčné smrti neuronů. [23,24]

Vzhledem ke komplikovanosti a poměrně dlouhé latentní době AN existuje pravděpodobně i mnoho dalších patofyziologických jevů spojených s tímto onemocněním. Příkladem může být působení hyperfosforylovaného tau proteinu, vliv neurozánětu nebo oxidačního stresu spojených s apoptózou neuronů. [10] Na progresi a manifestaci onemocnění má zcela jistě velký vliv i životní styl, odolnost vůči stresu a přidružená závažná onemocnění pacientů. [2]

2.2 Léčba Alzheimerovy nemoci

AN se vyznačuje progresivním kognitivním poškozením lidského mozku a je hlavní příčinou vzniku demence. Boj s tímto onemocněním je jednou z největších výzev zdravotní péče 21. století, jelikož v současnosti neexistuje efektivní léčba tohoto onemocnění. Objev a zavedení nového kauzálně působícího léčiva je proto velmi žádoucí. Pro nastavení správné terapie je velmi důležitá včasná diagnostika onemocnění. [2,11] Současným terapeutickým cílem je zpomalit progresi onemocnění a udržet v co nejvyšší míře soběstačnost pacienta. V pokročilých fázích onemocnění je kladen důraz na pečovatelskou a paliativní službu.

2.2.1 Současná farmakoterapie

V České republice jsou v současné době klinicky užívané čtyři symptomaticky působící léčivé přípravky ze dvou terapeutických skupin: (1) inhibitorů acetylcholinesterasy (donepezil, rivastigmin, galantamin) a (2) blokátorů NMDA receptorů (memantin). Volba vhodné farmakoterapie se vždy odvíjí od aktuálního klinického stavu, míry poškození kognitivních funkcí a komorbidit vyskytujících se u konkrétního pacienta. Pokud se pacient nachází v počáteční či středně těžké fázi onemocnění, jsou k léčbě indikovány centrální inhibitory acetylcholinesterasy, při těžké demenci bývá indikován memantin. ^[5] Farmakoterapie AN je u většiny pacientů úspěšně kombinována se zavedením nefarmakologických opatření, mezi které nejčastěji patří udržování pravidelného denního režimu, omezení životních změn a dostatečná a pravidelná fyzická aktivita. V některých asijských zemích jsou schváleny a užívány rovněž huperzin-A a podmíněčně registrovaný sodium-oligomanát. Avšak rychlost, průběh a výsledky testování u těchto dvou látek vyvolávají v západních zemích zatím spíše rozporuplné reakce. ^[25] V posledních letech byla do terapie AN zařazena rovněž dvě léčiva ze skupiny monoklonálních protilátek proti amyloidu β . V roce 2021 byla v USA, ve Spojených Arabských Emirátech a v Kataru schválena k medicínálnímu užití monoklonální protilátka aducanumab a v lednu roku 2023 v USA protilátka lecanemab. ^[26,27]

2.2.1.1 Inhibitory acetylcholinesterasy

Z „klasické“ cholinergní teorie vzniku AN plyne, že nedostatečná cholinergní aktivita je při onemocnění AN způsobená primárně snížením koncentrace neuromediátoru acetylcholinu. Acetylcholinesterasa (AChE) je enzym fyziologicky zajišťující hydrolýzu acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou. ^[28] Molekula tohoto enzymu je složena z řetězců α a β a v její struktuře se vyskytuje aktivní místo a periferní anionické místo. Aktivní místo je tvořeno α anionickým místem (karboxyl glutamové a asparagové kyseliny) a estratickým místem (hydroxyl serinu). Periferní místo se nachází u vstupu do aktivního místa a je složeno z pěti aminokyselin (3x tyrosin, kyselina asparagová a tryptofan). ^[29]

Při terapeutické inhibici AChE dochází k relativnímu synaptickému nadbytku acetylcholinu, který je nezbytně nutný pro účinný přenos signálu v CNS. Rovněž bylo pozorováno, že i v amyloidních placích se objevuje AChE, jejíž periferní anionické místo se podílí na tvorbě amyloidních fibril. V současné době je tedy snahou najít AChE inhibitory, které blokují nejen aktivní místo enzymu a způsobují potenci cholinergního systému, ale zároveň molekuly vázající se do periferního anionického místa a zabraňující tak tvorbě amyloidu β . [28,30] Z klinického pohledu inhibice AChE zpřičiňuje časově omezené symptomatické zlepšení stavu u mírné a střední závažnosti onemocnění.

Prvním ze zavedených inhibitorů AChE byl v roce 1993 **takrin**. Toto léčivo bylo však později z trhu staženo z důvodu nežádoucích účinků [31] a podrobněji o jeho účincích pojednávají následující kapitoly disertační práce.

Druhým inhibitorem z této skupiny je **donepezil**, který byl uveden na trh o tři roky později společnostmi Eisai a Pfizer pod obchodním názvem Aricept. [10,32] Chemicky jde o piperidinový derivát, který se v léčivých přípravcích vyskytuje ve formě hydrochloridu. Jedná se o vysoce selektivní reverzibilní inhibitor acetylcholinesterasy, který se váže na aromatický kruh tryptofanu 84 v periferním anionickém místě enzymu. [33] Dostupný je ve formě potahovaných, rozpustných tablet nebo ve formě suspenze. Dávkování se pohybuje mezi 5-10 mg/den a jeho biologický poločas eliminace je 70 h. [5,34] Metabolizace probíhá za účasti cytochromu P450 (isoformy 3A4 a 2D6) a mezi hlavní identifikované metabolity patří aktivní metabolit 6-O-desmethyldonepezil, dále pak donepezil-cis-N-oxid, 5-O-desmethyldonepezil a jeho glukuronidový konjugát. V případě klinického užití donepezilu se vyskytují zpravidla nezávažné nežádoucí účinky, jako je například průjem, nauzea nebo bolest hlavy. [34–36]

Dalším inhibitorem této skupiny je karbamátový derivát **rivastigmin**, který byl poprvé registrovaný v EU pod značkou Exelon v roce 1998. [10] Rivastigmin je neselektivním inhibitorem enzymů AChE i butyrylcholinesterasy. Při jeho působení dochází k velmi pomalé disociaci komplexu enzym-rivastigmin, a proto je možné označit ho jako pseudoireverzibilní inhibitor. Je vysoce selektivní a velmi dobře se distribuuje do nejvíce postižených oblastí mozku (hippocampus a neokortex). Jeho přesný mechanismus působení však není zatím zcela známý. Předpokládá se jeho vazba na estratické místo v aktivním centru v kombinaci s vazbou na periferní anionické místo AChE. [33] Stejně jako donepezil se i rivastigmin používá k léčbě mírně až středně závažné

formy AN a podává se většinou ve formě soli – tartarátu. Dávkovací schéma je 1,5 – 6 mg dvakrát denně, jelikož rivastigmin je v lidském těle poměrně rychle hydrolyzován na dekarbamoylovaný metabolit. ^[5,34,36] Jeho biologický poločas je přibližně 1 hodina. U rivastigminu se poměrně často po prvních dávkách vyskytují nežádoucí účinky jako je nevolnost a zvracení. ^[34,36,37] Zavedení transdermální formy do terapie znamená výrazné snížení výskytu těchto nežádoucích účinků. ^[6,38]

Prozatím posledním registrovaným léčivem této skupiny byla v roce 2001 molekula **galantaminu**. Jedná se o fenantrenový alkaloid s terciární aminoskupinou, který byl poprvé izolovaný ze sněženky podsněžníku (*Galanthus nivalis*). ^[39] V současné době je však připravován chemicky ve formě hydrobromidu. Galantamin je nejen selektivním, kompetitivním a reverzibilním inhibitorem AChE,^[40] ale působí také alostericky na vazebné místo nikotinových receptorů, což u pacientů zvyšuje efektivitu přenosu nervového vzruchu a udržuje tak kognitivní funkce mozku. ^[33,34] Komerčně dostupný je ve formě tablet nebo tobolek s postupným uvolňováním a podává se v jedné ranní dávce s obsahem 8 - 24 mg účinné látky. V těle je tato látka metabolizována pomocí CYP2D6 na O-desmethylgalantamin, a také za účasti CYP3A4 na N-oxid-galantaminu. Obecně je tato látka u pacientů velmi dobře snášena a je považována za bezpečnou. Vyskytující se nežádoucí účinky jsou spojeny s cholinergním účinkem na periferní nervový systém. Jedná se povětšinou o nevolnosti, zvracení, průjem, případně nechutenství. Tyto nežádoucí účinky většinou netrvají déle než několik dní od zahájení terapie nebo navýšení dávky. ^[33,34,36]

2.2.1.2 Antagonisté N-methyl-D-aspartátových receptorů

Mechanismem účinku antagonistů NMDA receptorů je snížení uvolňování excitotoxicky působícího glutamátu, který je přítomen v mozku při AN. NMDA receptor může obsahovat až tři různé podjednotky (GluN1, GluN2, GluN3) ale pouze GluN2 podjednotka je zodpovědná za vazbu glutamátu.

Memantin byl v roce 2002 schválen a zaregistrován jakožto jediný zástupce této skupiny. ^[5] Jedná se o nekompetitivního antagonistu na NMDA receptorech se středně silnou afinitou. Mechanismem účinku memantinu je úprava excitačně působící zvýšené hladiny glutamátu, která vede ke ztrátě základních fyziologických funkcí neuronálních buněk. ^[41] Mimo antagonismus na NMDA receptorech byla prokázána u memantinu

rovněž schopnost potencovat aktivitu protein fosfatasy A2 (PP2A), což vede k potlačení hyperfosforylace tau proteinu při AN. Memantin je indikován pro léčbu středně těžké až těžké AN a jeho maximální dávka je 20 mg/den. V lidském organismu je odbouráván na N-3,5-dimethyl-gludantan, 4- a 6-OH-memantin a 1-nitroso-3,5-di methyl-adamantan. Léčba memantinem je obecně považována za bezpečnou. Jako rizikové lze označit jeho lékové interakce s dopaminergními agonisty, anticholinergiky a barbituráty, které je vždy potřeba důkladně monitorovat. [10,42]

2.2.2 Vývojové směry nových terapeutických skupin pro léčbu Alzheimerovy nemoci

Vzhledem ke stále se zvyšujícímu počtu nově diagnostikovaných pacientů s AN a k absenci kauzálního léčiva, je vývoji nových účinných látek pro léčbu této nemoci dlouhodobě věnována velká pozornost. Mezi nejvýznamnější vývojové směry patří eliminace amyloidu β (inhibitory β -sekretasy a γ -sekretasy, monoklonální protilátky), nové inhibitory acetylcholinesterasy (takrinové analogy a další) a léčiva zaměřená na tau protein. Každoročně se objevuje několik velmi nadějných kandidátů na nové léčivo, avšak u většiny z nich bývá vývoj zastaven v průběhu II. a III. fáze klinického hodnocení primárně z důvodu nedostatečné účinnosti nebo nežádoucích účinků. [6]

Zamýšleným mechanismem účinku u inhibitorů β -sekretasy je snižování hladiny amyloidu β v mozku. První molekuly z této skupiny byly odvozeny od krátkých fragmentů prekursorového proteinu, avšak měly špatnou perorální dostupnost, krátký poločas, rychle se metabolizovaly a pouze omezeně prostupovaly přes hematoencefalickou bariéru. [20,43] V současnosti se vývoj zabývá již optimalizovanými strukturami látek, které výše uvedené nedostatky téměř eliminovaly, avšak jejich testování bylo prozatím ukončeno v různých fázích vývoje. Příkladem takových molekul mohou být lanabacestat, [44] verubecestat, [45] elenbecestat nebo molekula LY2886721. [46] Obecně lze konstatovat, že se jedná o perspektivní skupinu, u které je však prozatím ještě mnoho nezodpovězených otázek. [47]

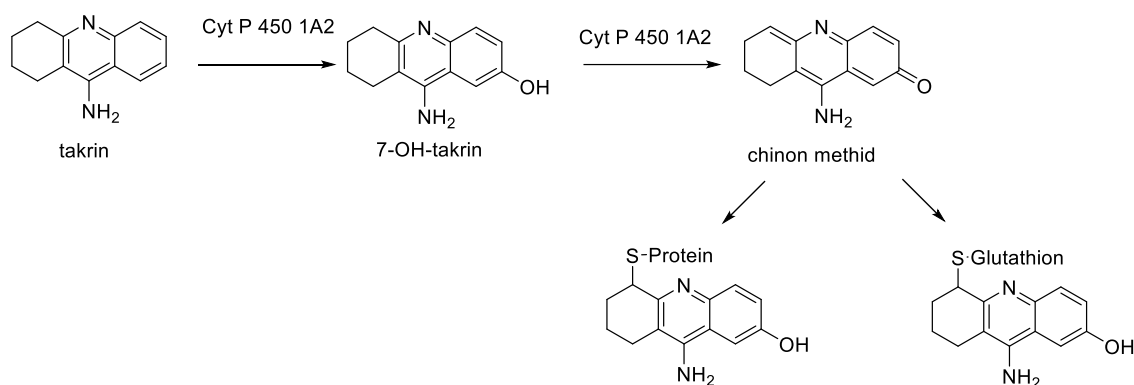
U látek ze skupiny inhibitorů γ -sekretas (semagacestat, MK-0752, E2012, avagacestat, [48] nirogacestat, [49] begacestat [50]) je velmi častá nespecifická inhibice a toxicita. Prozatím se tedy zdá, že se nejedná o příliš perspektivní skupinu kandidátů na zavedení do klinické praxe. [51]

Další slibnou oblastí vývoje jsou léčiva zaměřená na redukci nadměrné fosforylace tau proteinů. Mezi kandidáty na léčiva se často objevují modulátory GSK-3 β , CDK5 (cyklin dependentní kinasa 5) a PP2A (protein fosfatasa 2A). Mezi látky způsobující snížení agregace hyperfosforylovaných tau proteinů lze zařadit i methylenovou modř, antrachinon nebo rhodanin. [52–54]

2.2.2.1 Takrin

Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin) je molekula, která byla zavedena do terapie AN v roce 1993 primárně pro své inhibiční účinky na AChE. [55] Později bylo prokázáno, že tato molekula dokáže díky schopnosti blokovat NMDA receptory působit duálním mechanismem účinku a zasahuje tak do patofyziologie AN mnohem komplexněji. [56] Po dvaceti letech klinického užívání byl však přípravek Cognex® (takrin hydrochlorid) stažen z trhu. Hlavní příčinou byla zjištěná chronická hepatotoxicita (DILI, drug-induced-liver-injury) projevující se zvýšením hladin jaterních ALT (alanin-amino-transferasa) a AST (aspartat-amino-transferasa) enzymů. [57] Toto zvýšení hladin je připisováno jaterní metabolizaci takrinu. [58–60]

Takrin se v játrech metabolizuje cytochromem P450 (primárně jeho izoformou 1A2) na monohydroxy- a dihydroxy- deriváty, které jsou následně konjugovány (nejčastěji s kyselinou glukuronovou) na metabolity druhé fáze. [31,61,62] V literatuře byla v *in vitro* a *in vivo* lidských studiích popsána a prokázána tvorba 1-OH, 2-OH, 4-OH, 7-OH takrinu a několika jeho dihydroxyderivátů. Jako původce hepatotoxicity je označován 7-OH-takrin, který je považován za prekursor v játrech vznikajícího chinon methidu. [31,58,59,62] Chinon methid je vysoce reaktivní molekulou, která *in vitro* velmi rychle atakuje volné thiolové skupiny a vytváří tak adukty s glutathionem a proteiny obsahujícími SH skupiny. Tím dochází k depleci glutathionu a k narušení správné funkce jaterních proteinů (Obrázek 1). [63,64] Nicméně příčina hepatotoxicity takrinu je komplexní a nebyla v literatuře prozatím dostatečně objasněna.



Obrázek 1: Biotransformace takrinu na hepatotoxické produkty. [62,63]

2.2.2.2 Deriváty takrinu

Takrinový skelet je s ohledem na jeho mechanismus účinku široce používaný nejen pro vývoj nových látek potenciálně využitelných pro léčbu neurodegenerativních onemocnění ale i pro léčbu malárie, rakoviny a jiných onemocnění. [66–68] Vývoj nových derivátů takrinu, které by *in vivo* nepůsobily hepatotoxicky je tedy velmi žádoucí. Potenciálně netoxických derivátů bylo v posledních letech syntetizováno a testováno široké spektrum. [69] Obecně je lze rozdělit na substituované deriváty takrinu a hybridní molekuly takrinu.

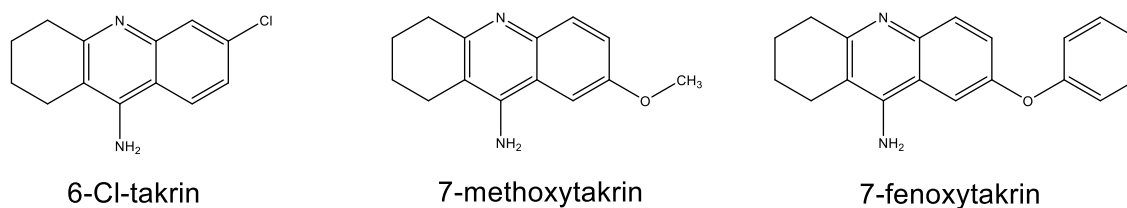
V případě vývoje hybridních molekul takrinu se většinou jedná o chemické spojení dvou odlišných molekul s cílem zlepšit vlastnosti finální hybridní molekuly. Principem je kombinace více terapeutických účinků a dalších vhodných vlastností v jedné hybridní molekule. Příkladem jsou molekuly takrin-trolox, takrin-tryptofan, takrin-donepezil, bistakrin a jiné. Trolox může vnést do hybridní molekuly svoje antioxidační účinky, tryptofan snižuje kumulaci β – amyloidových plaků a zlepšuje dostupnost takrinu v mozkové tkáni. Zavedením donepezilu nebo zdvojením takrinu může být zvýšena schopnost selektivní inhibice AChE. [70–73] Z mnoha důvodů prozatím nebyla nalezena optimální skupina hybridních sloučenin, která by vedla k nalezení nového léčiva v AN. [74]

Substituovaných derivátů takrinu bylo v posledních 30 letech syntetizováno několik stovek. Následující kapitola se bude primárně zabývat vybranými deriváty, které mohou mít vliv na vznik toxického prekursoru 7-OH takrinu.

2.2.2.2.1 Vybrané substituované deriváty takrinu

Jednou z cest jak zabránit tvorbě hepatotoxického metabolitu 7-OH-takrinu je substituce takrinového skeletu na aromatickém jádře v blízkosti pozice 7. Příkladem

těchto racionálních substitucí je syntéza 6-Cl-takrinu nebo 7-methoxytakrinu (7-Meota) (Obrázek 2) a jeho derivátů. Mechanismus účinku a výsledky *in vitro* a *in vivo* testování molekul 7-Meota a 6-Cl-takrinu jsou v literatuře poměrně rozsáhle charakterizovány, avšak kompletní popis jejich metabolizace a následného vlivu na potenciální hepatotoxicitu *in vivo* není ve studiích uveden. [75–77] Zde vznikl prostor pro doplnění vztahu metabolizace a hepatotoxicity těchto molekul.



Obrázek 2: Vybrané deriváty takrinu.

7-Meota má velmi podobný farmakokinetický a farmakodynamický profil takrinu. [78,79] Při testech toxicity na potkanech bylo prokázáno, že 7-Meota je méně toxická. [78] 7-Meota prošla I. a II. fází klinického hodnocení s doporučením absolvovat fázi III. Během testování byla prokázána neuroprotektivní účinnost, schopnost blokace NMDA receptorů a dobrá CNS dostupnost. Po aplikaci zdravým dobrovolníkům byla 7-Meota dobře snášena v jednorázové dávce 2 mg/kg a v denních dávkách 7 mg/kg. [77,80] Před absolvováním III. fáze klinického hodnocení byly však experimenty s touto molekulou z důvodu změny politického uspořádání zastaveny a nebyly již nikdy obnoveny. [77,80,81] V současnosti je pozornost věnována spíše derivátům 7-Meoty. Jednou z cest k novému potenciálnímu léčivu je vývoj derivátů 7-methoxytakrinu s preferenční inhibicí NMDA receptorů. [82]

Další vybraným nadějným derivátem takrinu je 6-Cl-takrin. Výhodou této molekuly v porovnání s takrinem je její vyšší schopnost inhibice AChE a zlepšení prokognitivního efektu v behaviorálních testech u myši s uměle vyvolanými známkami onemocnění AN. Při testování v maximálních tolerovaných dávkách (potkan 5,5 mg/kg i. p., myš 5,5 mg/kg i. m.) nebyly zaznamenány žádné biochemické a histopatologické změny s výjimkou poklesu koncentrace kreatininu. [75,76] Tato molekula se tedy jeví jako velmi účinná a potenciálně netoxická, avšak je nezbytné další detailnější testování.

Další možnou cestou vývoje nových molekul je zavedení fenoxyskupiny právě do problematické polohy 7- za vzniku 7-fenoxytakrinu (7-Feota) (Obrázek 2). [83]

2.3 ADME studie

Při designu a vývoji nového léčiva je nutné zohledňovat tři základní parametry, a to jeho účinnost, bezpečnost a potenciální lékové interakce. Farmakokinetický profil látky je definován stanovením její absorpce, distribuce, metabolismu a eliminace (ADME).^[84] V devadesátých letech vykazovalo téměř 40 % testovaných látek v klinické fázi neakceptovatelné ADME parametry, a proto muselo být jejich další testování zastaveno. Jelikož se jednalo o vysokou neefektivitu ve vývoji léčiv, bylo následně testování základních farmakokinetických parametrů zařazeno do preklinické fáze. Okolo roku 2000 bylo z klinických studií vyřazeno již jen cca 10 % látek z důvodu nevhodných farmakokinetických parametrů.^[85] Šance na to, aby se nově zkoumaná účinná látka posunula do klinické praxe, je však stále velmi nízká, jelikož statisticky z 10 000 hodnocených sloučenin jich pouze 10-20 vstoupí do preklinických testování. Dále z nich pak 6 látek do klinické fáze I, 4 látky do fáze II, 2 látky do fáze III a pouze jedno z těchto léčiv bývá schváleno dle FDA (U. S. Food and Drug Administration).^[86,87]

Porozumění a studium ADME u nově testovaných látek je zásadní součástí vývoje nových léčiv. Jedná se o disciplínu vstupující do procesu výzkumu léčiv v několika různých fázích od jeho objevu až do fáze regulatorních procesů. Výsledkem ADME studií jsou rozsáhlé soubory dat, které jsou dále několikanásobně analyzovány a porovnávány mezi sebou s cílem co nejlépe predikovat a následně zhodnotit osud léčiva v lidském organismu.^[88,89]

ADME studie se v počátečních fázích vývoje nových léčiv soustředí na hodnocení vlastností látek s cílem vybrat vhodné kandidáty pro další testování.^[88,89] Mezi běžně prováděné *in silico*, *in vitro* a *in vivo* testy patří studium prostupu přes membrány a bariéry, orgánové distribuce a farmakokinetiky v animálních modelech, metabolizace apod. Na základě výsledků pak dochází k výběru vhodného kandidáta pro klinické hodnocení. Tento kandidát podstupuje následně další velmi podrobné farmakokinetické studie pro stanovení jeho absorpce, distribuce, biodostupnosti, metabolizace, exkrece, eliminace a toxicity (ADMET) v lidském organismu. Výsledkem těchto studií je soubor dat potřebných k registraci léčiva, který podléhá hodnocení regulatorních autorit. Bioanalytické laboratoře jsou v této oblasti nezbytné jako zdroj dat pro následná hodnocení. V praxi většina preklinického testování a analýz neprobíhá v laboratořích

s akreditací pro režim správné laboratorní praxe (SLP), ale běžně je snahou dodržovat základní pravidla pro práci v SLP. [84]

2.3.1 Absorpce

Prvním ze stanovovaných farmakokinetických parametrů je absorpce léčiva. Pro stanovení absorpce a biodostupnosti v preklinických fázích je zásadní výběr vhodného buněčného organismu a následně i vhodného animálního modelu. Mezi nejčastěji využívané buněčné linie pro studium absorpce patří Caco-2 (buňky z lidského adenokarcinomu tlustého střeva), MDCK II (Madin – Darby buňky z psích ledvin) nebo LLC-PK (buňky z ledvin prasete) buněčné linie. [90–92] Jako animální modely bývají velmi často využíváni laboratorní hlodavci, jako jsou potkani a myši, případně je možné využít modely savců, jako jsou prasata, psi nebo opice. [93]

Testovaná cesta podání při experimentálním stanovení absorpce by měla být stejná jako je zamýšlená cesta podání do lidského organismu po registraci léčiva. U většiny vyvíjených látek je snaha využívat co nejčastěji perorální podání. Před podáním léčiva je nutné provést hodnocení čistoty testované látky a znát její stabilitu. V rámci farmakokinetických plasmatických studií bývají většinou stanoveny parametry, jako jsou C_{max} (maximální koncentrace), t_{max} (čas, kdy byla naměřena maximální koncentrace), AUC (plocha pod křivkou), $T_{1/2}$ (biologický poločas), CL (clearance léčiva) apod.

2.3.2 Distribuce

Druhým základním farmakokinetickým ukazatelem je distribuce léčiva do tkání. Distribuce je proces, kdy léčivo a jeho metabolity vstupují a vystupují do různých buněčných a tkáňových soustav. Probíhá většinou pomocí permeace přes buněčné membrány, ke které dochází primárně pasivní difuzí. Nicméně speciální bariéry, jako například hematoencefalická bariéra, exprimují transportérové proteiny, které zabraňují nebo minimalizují prostup do jednotlivých tkání. Míra distribuce závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech testované látky (log P, pK_a , molekulová hmotnost, acidobazické vlastnosti, apod.), její vazbě na proteiny, permeabilitě a transportérové aktivitě. [94] Parametry pro studium orgánové a tkáňové distribuce většinou vychází

z farmakokinetických dat jako je t_{max} , $T_{1/2}$ apod. Většinou se jedná o testy po jednorázovém podání a to cestou zamýšlenou pro aplikaci do lidského organismu (p. o., i. v., i. m., apod.). Po stanoveném čase jsou studované části tkání odebrány, je k nim přidán roztok pufru a jsou homogenizovány, provedena úprava vzorku a analyzovány pomocí HPLC nebo HPLC-MS. Pro stanovení distribuce může být také využita technika radioaktivně značeného léčiva v kombinaci se zobrazovací technikou. [95]

Cílem studie je stanovit potenciální kumulaci v jednotlivých tkáních, porozumět distribuci léčiva mezi jednotlivými tkáňovými soustavami a zhodnotit jejich přestup přes různé bariéry v organismu. Velmi důležitým závěrem distribučních studií bývá určení, zda látka v organismu prostupuje do cílové orgánové soustavy pro zamýšlený účinek a zda přestupuje hematoencefalickou bariéru. Z bezpečnostních důvodů je nutné rovněž stanovit, zda látka vstupuje do spermatu a mohla by tak potenciálně ovlivňovat reprodukci, zda vstupuje do placenty a mohla by svými účinky ovlivňovat nenarozené dítě, případně, zda přestupuje do mateřského mléka a mohla by se tak distribuovat do organismu kojeného dítěte. [96]

U látek účinkujících v CNS je nezbytné stanovit jejich schopnost přestupu právě přes hematoencefalickou bariéru. Pro usnadněný prostup by tyto látky měly mít nízkou molekulovou hmotnost (< 400), střední lipofilitu ($\log P < 3$) a vhodný počet donorů a akceptorů vodíkových vazeb. [97,98] V současnosti existuje několik přístupů, jak při vývoji léčiva testovat jeho schopnost prostupu do CNS. Z buněčných modelů bývají velmi často pro simulaci využívány MDCK buněčné linie transfekované MDR1 genem. [99] V případě *in vivo* potkaních nebo myších modelů se jako vhodný způsob jeví stanovení koncentrací léčiva v mozku a plasmě po jednorázovém podání, ze kterých se následně vypočítá jejich poměr (mozek/plasma). Léčivo se považuje za CNS prostupující, pokud je tento poměr vyšší než 0,3. [100]

2.3.3 Metabolismus

U většiny léčiv dochází v lidském těle k částečné nebo úplné přeměně na metabolity, které jsou následně vylučovány močí nebo stolicí. Pokud je cestou eliminace léčiva jeho metabolizace, je velmi důležité monitorovat její míru a biotransformační kaskádu, jelikož metabolizace molekuly může velmi výrazně ovlivnit jeho účinnost a případně i bezpečnost. [101,102] V současnosti je již běžnou součástí preklinického

hodnocení nově testované látky snaha zachytit a popsat vznikající metabolity. Pro stanovení metabolické stability a metabolického profilu je v dnešní době využíváné celé spektrum *in vitro* a *in vivo* metod. [84]

In vitro testování slouží primárně pro identifikaci vznikajících metabolitů a pro specifikaci enzymů zodpovědných za metabolizaci. Mezi nejčastěji využívané *in vitro* modely metabolizace patří jaterní subcelulární frakce, jako jsou jaterní mikrosomy, S9 frakce, případně modely hepatocytů. Pro většinu léčiv, která jsou metabolizována pomocí systému CYP 450, bývají pro identifikaci metabolitů nejčastěji využívány jaterní mikrosomy. [103,104] Výhodou hepatocytárního modelu v porovnání s mikrosomy je plná komplementarita metabolických enzymů s lidskými jaterními buňkami. [105] Pro stanovení metabolické stability látky jsou využívány primárně inkubace s mikrosomy ukončované po určitém čase s cílem určit metabolickou stabilitu vyjádřenou jako poločas ($T_{1/2}$, half life) a její vnitřní clearance. V průběhu *in vitro* metabolických experimentů je vždy nutné monitorovat odpovídající viabilitu modelů s ohledem na potenciálně falešně negativní výsledky. [106]

Z důvodu dodržení etických pravidel pro zacházení s laboratorními zvířaty a pro redukcii počtu potřebných zvířat se při *in vivo* animálním testování metabolizace většinou přistupuje ke komplexnějšímu studiu farmakokinetiky (studium metabolismu v kombinaci s testováním absorpce, distribuce a exkrece). Mezi nejčastěji využívané modely patří myši, potkani, prasata, psi nebo například opice. Volba vhodného modelu je zásadní a je při ní potřeba zohlednit výsledky testů toxicity v předchozích preklinických fázích. Pro studium vznikajících metabolitů bývají nejčastěji odebírány vzorky plasmy, moči a stolice. V případě podezření na výskyt a kumulaci potenciálně toxického metabolitu mohou být analyzovány rovněž vzorky různých tkání. Pro testování metabolické stability léčiva *in vivo* jsou nejčastěji analyzovány vzorky plasmy v určitých časech po aplikaci látky. Následně mohou být ze stanovených koncentrací parentní látky a jejich metabolitů určeny poločas rozpadu látky, dále pak kinetika tvorby a eliminace jednotlivých metabolitů. [84]

Velmi důležité je při testování léčiva co nejdříve odhalit, zda nepodléhá některým komplikacím, které souvisí s jeho metabolismem. Příkladem může být paracetamol a jeho metabolizace na reaktivní metabolit, nebo lékové interakce mezi inhibitory (případně i induktory) CYP 450 a některými antibiotiky nebo hormonální antikoncepcí,

případně metabolické ovlivnění farmakokinetiky nebo farmakodynamiky léčiva apod. [107,108] Pokud jsou objeveny potenciálně nebezpečné metabolity, je třeba otestovat rovněž jejich toxikologický profil. [109,110]

2.3.4 Exkrece

Cílem studia exkrece je porozumět preferenčním cestám eliminace parentního léčiva a jeho metabolitů. Nejčastěji bývají léčiva vylučovány ve formě jejich hydrofilnějších metabolitů případně jako konjugované molekuly do moči, žluči nebo stolice. Informace z těchto studií jsou užitečné primárně pro charakteristiku hlavní eliminační cesty. [84]

2.4 Analytické nástroje pro stanovení farmakokinetických parametrů

V posledních sedmdesáti letech došlo k rychlému vývoji a modernizaci analytických nástrojů pro hodnocení ADME, které vyústily v zásadní zefektivnění a zrychlení stanovení základních farmakokinetických parametrů. Díky pokrokům v analytických technologiích a *in vitro* a *in vivo* technikách pro stanovení ADME došlo k výraznému urychlení preklinické vývojové fáze léčiva. Zároveň byla umožněna vyšší efektivita při volbě, zda dojde k posunu látky do klinických studií, kde jsou opětovně farmakokinetické parametry podrobně studovány a interpretovány.

Mezi nejčastěji využívané techniky pro stanovení ADME u nově testovaných látek patří spojení HPLC-MS. Tuto techniku dále doplňují nukleární magnetická resonance nebo například značení testované látky pomocí radioizotopů. [84,111]

2.4.1 Chromatografie

Chromatografické separace patří mezi základní a nejvíce využívané separační analytické metody. Principem separace je opakované ustalování rovnováhy a rozdílná distribuce dělených látek mezi nepohyblivou stacionární fází (SF) a pohyblivou mobilní fází (MF). Směs látek bývá nadávkovaná na začátek chromatografické kolony a je dále unášena proudem MF přes SF. Složky vzorku mohou různě silně se SF interagovat, čímž dochází k jejich separaci. Rozdíly v interakcích u jednotlivých složek směsi pak určují

kvalitu separace, která je při bioanalytickém hodnocení ADME velmi zásadním parametrem. Mezi nejčastěji využívané chromatografické metody v bioanalýze patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie, kterou v některých případech doplňuje plynová chromatografie a superkritická chromatografie. ^[112]

2.4.1.1 Kapalinová chromatografie

Objev kapalinové chromatografie je připisován Michailu Semjonoviči Cvětovi, který na počátku dvacátého století poprvé popsal princip separace v kapalně fázi při studiu dělení rostlinných barviv, jako jsou chlorofyly, xantofyly a karotenoidy. Název chromatografie je právě odvozen od pozorování dělení těchto barviv (chroma = barva; graphein = psát). ^[113,114] HPLC je v bioanalýze nejčastěji využívaným uspořádáním kapalinové chromatografie. ^[104]

2.4.1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Při HPLC uspořádání je mobilní fáze pumpována pomocí čerpadla do systému pod vysokým tlakem a ke chromatografické separaci dochází při průchodu vzorku analytickou kolonou. Separace a následná eluce analytů je ovlivněna povahou a složením jak stacionární tak mobilní fáze. Složení mobilní fáze může být v případě isokratické eluce po celou dobu analýzy konstantní nebo v případě gradientové eluce je poměr složek mobilní fáze postupně zvyšován ve prospěch složky s vyšší eluční silou. Tato eluce bývá s oblibou využívána pro separaci složitých a komplexních směsí analytů, které se velmi často vyskytují v případě analýzy biologických vzorků. ^[112]

Jako instrumentace pro HPLC se v praxi využívá kapalinový chromatograf, který je složen ze sedmi základních částí mezi které patří zásobníky mobilních fází, odplyňovač, vysokotlaká čerpadla, automatický dávkovač vzorku, termostatovaný kolonový prostor, detektor a počítačový systém pro vyhodnocení dat.

2.4.1.2.1 Základní HPLC charakteristiky

Chromatografický záznam odpovídá grafu závislosti odezvy signálu detektoru na čase analýzy a je označován jako chromatogram. Chromatogram je charakteristický křivkami Gausovského typu (píky). Základní kvalitativní charakteristickou veličinou v HPLC je retenční čas (t_R) analytu, který odpovídá době od nástřiku po vrchol píky.

Kvantitativní charakteristikou je pak plocha pod píkem (A). K popisu chromatografické separace bývají velmi často využívány další veličiny jako je selektivita a účinnost kolony, a dále také rozlišení a asymetrie píku. [112,115]

Při chromatografické separaci je snahou získat úzké, symetrické, dokonale oddělené gaussovské píky. Selektivita je parametrem popisujícím míru schopnosti chromatografického systému rozlišit jednotlivé složky vzorku a je možné ji vypočítat dle níže uvedené rovnice (1). [112,115]

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} \quad (1)$$

Selektivita (α) je vyjadřována jako poměr redukovaných retenčních časů (t'_R) nebo poměr retenčních faktorů (k). [112,115]

Separční účinnost kolony je popisována počtem teoretických pater (N). Jedná se o bezrozměrnou veličinu vyjadřující teoretický počet úseků (pater) na koloně, ve kterých je analytu umožněno interagovat se stacionární a mobilní fází a opakovaně tak ustálit rovnováhu mezi těmito fázemi. Počet teoretických pater je možné vypočítat dle rovnice (2); [112,115]

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{w_{0,5}} \right)^2 \quad (2)$$

kde t_R vyjadřuje retenční čas a $w_{0,5}$ šířku píku v 50 % jeho výšky. [112,115]

V průběhu analýzy vstupují do separačního procesu také velmi často některé kinetické děje, které mohou způsobit rozmytí elučních zón. K popisu rozmývání zón slouží dynamická van Deemterova teorie. Míra rozmývání zón separovaných látek je dána třemi procesy: vířivou difuzí analytu při průchodu kolonou, molekulární (podélnou) difuzí analytu v MF a odporem proti přesunu hmoty v MF a SF. Vlivem těchto kinetických dějů může docházet ke změně tvaru píku a ke zhoršení jeho symetrie. Symetrii píku je možné vyjádřit několika způsoby. Jedním z nich je faktor asymetrie (A_s), který lze vypočítat dle rovnice (3). [112,115]

$$A_s = \frac{t}{f} \quad (3)$$

Faktor asymetrie (A_s) je podílem šířek sestupné části píku (t) a vzestupné části píku (f) nejčastěji v 10% výšky píku. [111]

Druhým způsobem vyjádření symetrie je faktor chvostování píku (TF) (rovnice 4).
[115]

$$TF = \frac{f+t}{2f} \quad (4)$$

Faktor chvostování píku (TF) je podílem součtu šířek sestupné části píku (t) a vzestupné části píku (f) k dvojnásobku vzestupné části píku nejčastěji v 5% výšky píku. [115]

Jelikož hlavním cílem HPLC analýzy je získat dostatečnou separaci analytů v přijatelném čase, dalším z velmi důležitých parametrů je rozlišení mezi chromatografickými píky. Rozlišení je bezrozměrnou veličinou vyjadřující míru relativní separace dvou sousedních píků. V závislosti na autoritě je možné rozlišení stanovit dvěma způsoby (rovnice 5 a 6); [112,115]

$$R_{1/2} = \frac{1,18 \times (t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h1} + w_{h2})} \quad (5)$$

kde t_{R2} a t_{R1} odpovídají retenčním časům píků a w_{h1} a w_{h2} šířkám píků v polovině výšky. [112,115]

$$R_s = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)} \quad (6)$$

Kde t_{R2} a t_{R1} odpovídají opět retenčním časům píků avšak w_1 a w_2 vyjadřují šířky píků při základní linii. [112,115]

2.4.1.2.2 HPLC separační módy

HPLC analýzu je možné provádět v několika základních separačních (elučních) módech, které se liší na základě využití různých kombinací stacionárních a mobilních fází.

Prvním z HPLC elučních módů je mód nepolární (někdy označovaný i jako normální). V tomto módu je SF polární (silikagel, případně chemicky vázané fáze na jeho povrchu). Jako MF jsou využívány zejména nepolární rozpouštědla (*n*-alkany) velmi často s přídavkem nižších alkoholů. Tato rozpouštědla ovlivňují především π - π interakce a dipólové interakce. Nepolární mód může být v praxi s výhodou nahrazen hydrofilní interakční chromatografií (HILIC). Nejčastěji popisovaným a nejpravděpodobnějším mechanismem tohoto typu chromatografie je rozdělování mezi hydrofobní části MF tvořené nejčastěji acetonitrilem a silně hydrofilní vrstvou vody, která je imobilizována na povrchu SF. Na interakcích se rovněž podílí i adsorpce. [112]

Druhým elučním módem je mód reverzní. V tomto módu je běžně využívána vodná/pufrová složka MF ve směsi s acetonitrilem, methanolem, propanolem nebo tetrahydrofuranem. Používané pufry mohou být buď roztoky anorganické soli jako jsou např. fosforečnany, chloristany, sírany, apod., případně organické soli jako jsou mravenčany, octany a další. Využívané SF jsou nepolárního charakteru. Velmi často se jedná o dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na povrch silikagelu nebo jiných kovových oxidů. Z pohledu interakcí, zde nacházejí uplatnění především iontové a elektrostatické interakce, π - π a coulombické interakce, interakce dipól-dipól a hydrofobní interakce. [112]

Třetím z elučních módů je mód polárně organický. V tomto módu nalézají své uplatnění organická rozpouštědla (nejčastěji acetonitril a methanol) s přidavkem některých organických kyselin (např. kyselina octová, mravenčí, trifluoroctová) a organických bází jako je triethylamin v daném poměru.

Výběr elučního módu závisí velmi často na konkrétní rozpustnosti separovaných analytů. Pokud je analyt dobře rozpustný ve vodě, je vhodné zvolit mód reverzní. Pokud je však analyt lépe rozpustný v organickém rozpouštědle, pak jsou lepší volbou módy nepolární a polárně organický. Obecně úspěšnost separace klesá v pořadí reverzní mód > polárně organický mód > nepolární mód. Pro oblast bioanalýzy je většinou využíván mód reverzní. [112,115]

2.4.1.2.3 Stacionární fáze

Stacionární fáze je náplň chromatografické kolony, ve které dochází k vlastnímu separačnímu procesu. Z pohledu úspěšnosti separace je volba vhodné stacionární fáze pro danou aplikaci velmi důležitá. V současné době je na trhu pro bioanalýzu malých molekul dostupné velmi široké spektrum stacionárních fází plněných do kolon různých délek (nejčastěji 50-250 mm) a průměrů (nejčastěji 2,1-4,6 mm). Při volbě vhodné délky, průměru a velikosti částic v koloně (nejčastěji 1,7-5 μ m) je důležité zohlednit nejen typ analyzovaného vzorku a fyzikálně chemické vlastnosti stanovovaných analytů ale i kompatibilitu s tlakovými možnostmi systému. Stacionární fáze je v případě potřeby možné v rámci jedné analýzy různě kombinovat díky zapojení více kolon ve formátu 2D chromatografie. [112,115]

2.4.1.2.4 Silikagel

Silikagel (silica) je nejrozšířenějším anorganickým materiálem používaným buď v nemodifikované formě jako stacionární fáze nebo jej lze dále modifikovat a získat tak celou paletu stacionárních fází lišících se svými vlastnostmi. Jeho vlastnosti jako vysoká mechanická odolnost, neobtnavost, nesrážlivost a inertnost z něj činí téměř ideální nosič. ^[112] Na povrchu silikagelu se nacházejí hydroxylové skupiny (silanoly), které udělují silikagelu polární charakter. Silanoly a jejich typ (volné silanoly, vicinální silanoly, geminální silanoly) mohou mít výrazný vliv na chromatografické chování silikagelu. V reverzním módu jsou interakce analytů s těmito volnými skupinami většinou nežádoucí, a proto se přistupuje k jejich odstínění nebo blokaci pomocí některých z funkčních skupin nebo ligandů. ^[112,116,117]

Mezi nejčastěji využívané chemicky vázané SF na silikagel patří osmnácti uhlíkatý alkanový řetězec (C18), osmi uhlíkatý alkanový řetězec (C8) nebo fenylová, bifenylová, pentafluorofenylová (PFP) případně diolová fáze. Hlavní slabinou chemicky vázaných fází je jejich omezená stabilita v bazickém a silně kyselém prostředí, nicméně existují technologie, jako je například ethylen-bridged technologie, které jsou schopny využitelné pH rozmezí rozšířit. ^[115] Zvýšení stability silikagelu v oblasti nízkého pH může být dosaženo pomocí prodloužení vázaného řetězce, ^[118] zvýšením počtu kovalentních vazeb mezi organosilanem a silikagelem, ^[119] případně modifikací povrchu stericky chráněnými silany. ^[120] Stabilita silikagelu v oblasti vyššího pH je možná navýšit například pomocí endcappingu. ^[121]

Fenylové SF mají v porovnání s nejčastěji využívanou C18 modifikací sníženou lipofilitu a odlišnou selektivitu k donorům elektronů, zejména díky působení π - π interakcí. ^[122] Bifenylová fáze poskytuje vyšší retenci a lepší selektivitu k polarizovatelným a hydrofilním aromatickým sloučeninám. ^[112] Fluorované stacionární fáze vykazují dobrou selektivitu vůči polohovým isomerům halogenovaných analytů a vzhledem k interakcím dipól-dipól, π - π a coulombickým interakcím poskytují vyšší retenci pro aromatické látky a polycyklické uhlovodíky. ^[123,124] π - π Interakce lze dobře využít i pro separaci polohových a cis/trans isomerů. ^[112,125]

2.4.1.2.5 Detektory

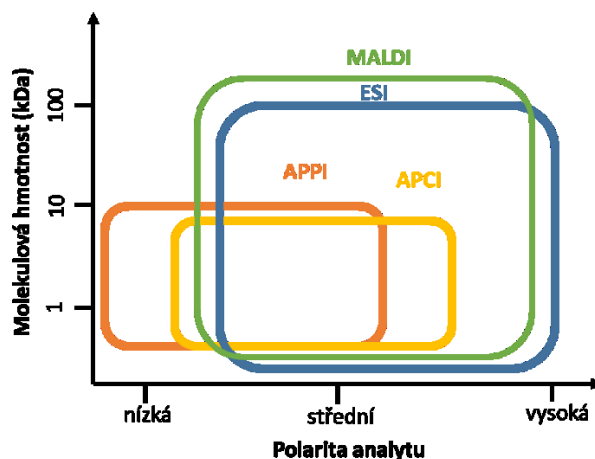
Detektory v HPLC slouží pro zaznamenání rozdílu signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze obsahující analyt. Důležitými vlastnostmi pro ideální detektory jsou vysoká citlivost, univerzálnost, selektivita, linearita odezvy, nedestruktivnost, spolehlivost a stabilní a předvídatelná odezva. ^[115] Samozřejmě je technologicky velmi obtížné, ne-li nemožné, zkombinovat všechny výše uvedené vlastnosti do jednoho typu detektoru, proto je nejvhodnější detektor vybírán na základě kompromisu, případně lze sériově zapojit více typů detektorů. Nejčastěji využívanými HPLC detektory jsou spektrofotometrické detektory. Méně používanou variantou je detekce založená na principu snímání fluorescence nebo chemiluminiscence, případně detekce za využití elektrochemických, refraktometrických nebo vodivostních vlastností analytů. Mezi modernější a velmi univerzální detektory je možné zařadit detektory na bázi aerosolu a hmotnostně-spektrometrickou detekci. ^[112]

2.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS, mass spectrometry) je jednou z pokročilých analytických technik, která se velmi často používá pro kvalitativní a kvantitativní charakteristiku molekul v nízkých koncentracích. Analýza látek probíhá ve třech základních krocích. Prvním krokem je ionizace analytu, kdy v iontovém zdroji dochází k převodu neutrální molekuly na ionty. Poté následuje rozdělení iontů dle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) v hmotnostním analyzátoru a posledním krokem je detekce iontů, zesílení signálu a sběr naměřených dat. ^[126]

2.4.2.1 Ionizační techniky

Pro ionizaci analytů je možné v současné době využít poměrně široké spektrum technik. Volba vhodné techniky je ovlivněna primárně fyzikálně-chemickými vlastnostmi stanovovaných analytů, jako je těkavost, tepelná stabilita, molekulová hmotnost a polarita (Obrázek 3). ^[65,127]



Obrázek 3: Využití ionizačních technik v závislost na polaritě a molekulové hmotnosti analytu.

[127]

Obecně nejčastěji využívanými technikami ve spojení s HPLC jsou ionizace elektrosprejem (ESI, electrospray ionization) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, atmospheric pressure chemical ionization). Méně často jsou v praxi využívány fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI, atmospheric pressure photoionization) a off-line ionizace desorcí laserem za účasti matrice (MALDI, matrix assisted laser desorption ionization). [128] Všechny výše uvedené techniky je možné zařadit mezi měkké ionizační techniky, které při záznamu kladných iontů poskytují protonované molekuly $[M+H]^+$, případně adukty s ionty vyskytujícími se v mobilní fázi (nejčastěji se sodíkem nebo draslíkem). Při záznamu záporných iontů jsou detekovány nejčastěji deprotonované molekuly ve formě $[M-H]^-$, případně ve formě záporně nabitých aduktů (např. s octanem nebo mravenčanem). [129] Ionizace elektrosprejem jsou společně s MALDI nejčastěji využívanými ionizačními technikami v bioanalýze. ESI dokáže pokrýt největší oblast analytů s ohledem na jejich polaritu a molekulovou hmotnost. MALDI ionizace bývá primárně využívána v klinických oblastech jako je mikrobiologie a biochemie. Iontové zdroje mohou být rovněž různě kombinovány v rámci jednoho instrumentu. [130–134]

2.4.2.1.1 Ionizace elektrosprejem

Při ionizaci elektrosprejem vstupuje eluát z kolony za atmosférického tlaku do kapiláry, na kterou je aplikováno vysoké napětí (obvykle do +/- 5 kV). Na výstupu z kapiláry je proud kapaliny nebulizován (většinou s dusíkem) za vzniku nabitých kapiček s vysokým obsahem iontů. Dále je přiváděn sušící plyn, díky kterému dochází k odpaření

mobilní fáze. Koncentrace iontů v kapičkách postupně roste a zvyšují se tak i odpudivé síly uvnitř kapky. Když odpudivé síly překonají povrchové napětí, kapka exploduje na menší kapičky a dojde k uvolnění nabitých částic. Tento proces, který se několikrát opakuje, je označován jako coulombická exploze. [129,135–137] Zvolené rozpouštědlo (methanol, acetonitril) a přídavek aditiva (nejčastěji hydroxid amonný, kyselina mravenčí, kyselina octová, octan amonný nebo mravenčan amonný) v MF mohou mít výrazný vliv na ESI ionizaci jednotlivých analytů, jelikož mohou zapříčinit zvýšení nebo snížení celkové efektivity ionizace. [138]

2.4.2.2 Hmotnostní analyzátory

Hmotnostní analyzátor slouží k dělení iontů v plynné fázi za vakua podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). K rozdělení iontů je možné použít několik různých fyzikálních principů. Zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli využívají analyzátory magnetické a elektrostatické. Iontová past a kvadrupól je založena na rozdílné stabilitě oscilací iontů v dvoj- nebo trojrozměrné konfiguraci. Analyzátor doby letu využívá různé rychlosti letu iontů a orbitální past (orbitrap) využívá různou frekvenci harmonických oscilací. Principem iontové cyklotronové rezonance je různá frekvence rotace při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli. Iontová cyklotronová rezonance a orbitrap jsou dva typy analyzátorů využívající Fourierovu transformaci pro převod měřeného signálu do podoby hmotnostních spekter. Různé typy analyzátorů mohou být dále kombinovány za vzniku například trojitého kvadrupólu (QqQ), kvadrupólu spojeného s analyzátozem doby letu (q-TOF) a podobně. [65,126]

Typ zvoleného analyzátoru zásadně ovlivňuje kvalitu získaných hmotnostních spekter a také finanční nároky na analýzu. Mezi jeden z nejdůležitějších parametrů hmotnostního spektrometru patří jeho rozlišovací schopnost, která je definována jako poměr m/z měřeného iontu a šířky tohoto iontu $\Delta(\frac{m}{z})$ v jeho stanovené výšce (rovnice (7)). [126]

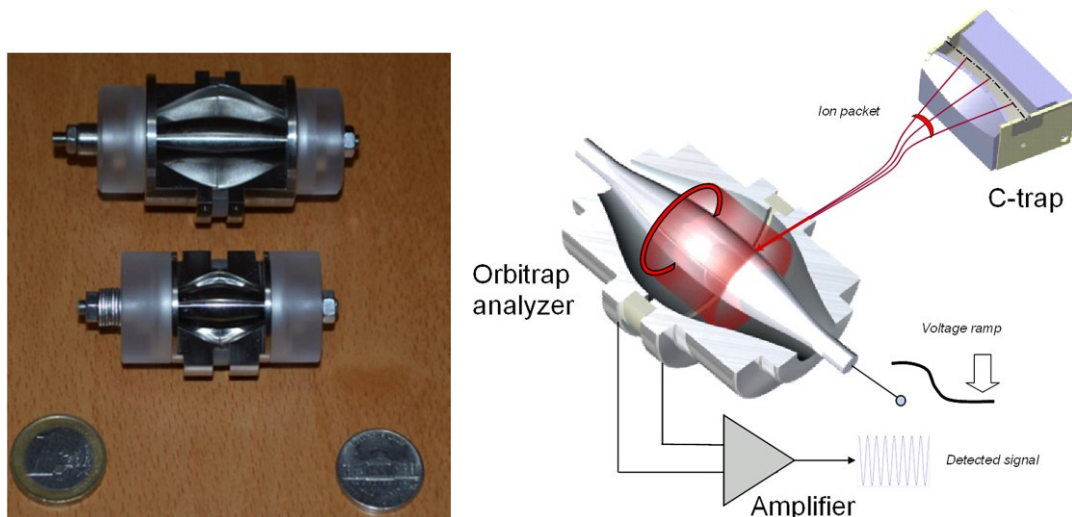
$$R = \frac{\frac{m}{z}}{\Delta(\frac{m}{z})} \quad (7)$$

Spektra s vysokou rozlišovací schopností (HRMS, high resolution mass spectrometry) poskytují analyzátory typu orbitrap, iontová cyklotronová rezonance

a analyzátor doly letu, naopak nižší rozlišovací schopnost mají kvadrupól nebo iontová past. Dalším důležitým parametrem je přesnost a správnost určení poměru m/z . Přesnost nebo také chybu určení hodnoty m/z lze vypočítat v jednotkách ppm (parts per milion) jako rozdíl m/z stanovený experimentálně a m/z vypočtený teoreticky podělený m/z hodnotou vypočtenou teoreticky a vynásobený 10^6 . Právě stanovená chyba v ppm udává, jakou odchylku mají naměřené hodnoty ve spektrech v porovnání s teoreticky vypočítanou hodnotou pro danou molekulu. ^[129,139]

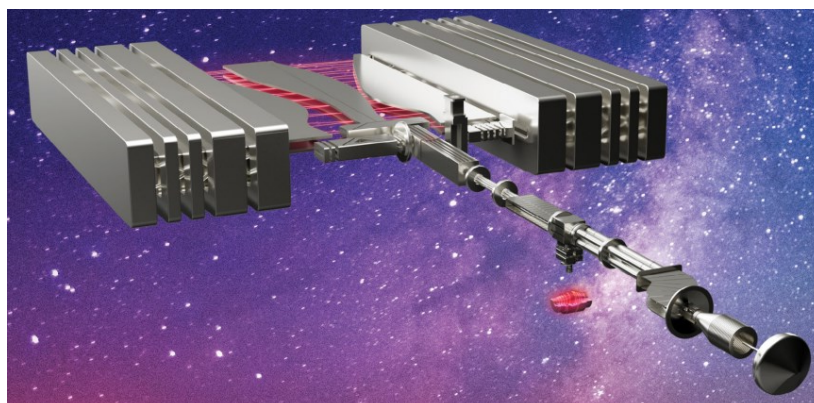
2.4.2.2.1 Orbitrap

V oblasti analyzátorů s Fourierovou transformací byl od roku 1960 až do roku 2005 k dispozici pouze analyzátor pracující na principu iontové cyklotronové resonance. Vzhledem ke své pořizovací ceně a nutnosti přítomnosti supravodivého magnetu a vysokým prostorovým nárokům je pro běžnou praxi poměrně nepraktickou volbou. V roce 2005 byl na trh poprvé uveden hmotnostní analyzátor typu orbitální pasti v kombinaci s lineární iontovou pastí, který využívá Fourierovu transformaci. ^[65,84,140–142] V analyzátoru typu orbitální pasti bývají běžně přítomny tři elektrody. Dvě vnější elektrody mají tvar pohárků, které jsou k sobě obráceny tak, aby vytvořili prostor pro pohyb iontů. Vřetenovitá centrální elektroda udržuje past pohromadě a vyrovnává ji pomocí dielektrických koncových rozpěrek ([Obrázek 4](#)). Ionty jsou při analýze vstřikovány mezi centrální a vnější elektrody a díky vloženému napětí dochází k jejich pohybu po kruhové spirále. Axiální elektrické pole, vytvořené díky speciálnímu konickému tvaru elektrod, směřuje ionty k nejširší části pasti a spouští specifické harmonické axiální oscilace. Digitalizovaný obrazový proud iontů o určitém poměru m/z v časové oblasti je pomocí Fourierovy transformace převeden do hmotnostního spektra. ^[65] Velmi důležitou součástí orbitální pasti je pulzní vstřikování iontů z externího zařízení označované jako C-trap. Toto zařízení zajišťuje účinné oddělení orbitální pasti od jakéhokoliv předchozího zdroje proudu iontů a umožňuje tak připojit k orbitrapu jakoukoli fragmentační techniku. ^[139,143–146] Fotografie a schematické znázornění orbitrapu je uvedeno na [obrázku 4](#).



Obrázek 4: Ilustrační fotografie orbitální pasti (vlevo) a schematické znázornění uspořádání tří elektrod v analyzátoru typu orbitrap (vpravo).^[65]

Orbitální iontová past může být v současnosti spojena nejen s lineární iontovou pastí (řada přístrojů LTQ Orbitrap), ale také s kvadrupólovým hmotnostním filtrem (řada Q Exactive a Exploris) nebo může být propojen přímo se zdrojem iontů (přístroj Exactive).^[143] Novinkou v oblasti orbitálních pastí, která je uváděna na trh v roce 2023, je orbitrap typu Astral, který je kombinací třech různých hmotnostních analyzátorů (Obrázek 5). Jako první je v tomto uspořádání zařazen kvadrupólový analyzátor pro získání vysoké selektivity a dostatečné propustnosti iontů, dále pak orbitální past pro měření s vysokým rozlišením a dynamickým rozsahem a nový typ analyzátoru astral umožňující díky delší dráze iontů rychlá a citlivá fragmentační měření. Zamýšlenou aplikací pro orbitrap Astral jsou prozatím primárně proteomické analýzy.^[147]



Obrázek 5: Schematické uspořádání orbitální pasti typu Astral (ThermoFisher Scientific).^[140]

Hlavní výhodou analyzátorů typu orbitrap v porovnání s ostatními komerčně dostupnými variantami je jejich vysokorozlišovací schopnost, velký dynamický rozsah,

dobrá senzitivita a v neposlední řadě nízké prostorové nároky na umístění instrumentu. Na druhou stranu pomalejší skenovací rychlost, vysoké pořizovací náklady a náročnost obsluhy pro operátora mohou být považovány za nevýhodu v porovnání s ostatními typy hmotnostních spektrometrů. [65]

2.4.2.2 Měřicí módy v uspořádání orbitrap Q Exactive

Pro lepší orientaci v měřících módech na přístrojích typu Q Exactive jsou jeho jednotlivé kompartmenty zobrazeny na [obrázku 6](#). Hmotnostní spektrometr obsahuje kvadrupól sloužící jako hmotnostní filtr úzkého rozsahu m/z , C-trap pro ukládání iontů, kolizní celu pro fragmentaci a hmotnostní analyzátor typu orbitrap pro detekci a analýzu iontů. Díky tomuto uspořádání je hmotnostnímu spektrometru umožněno pracovat v několika odlišných měřících módech. [148]



Obrázek 6: Schematické uspořádání jednotlivých kompartmentů v analyzátoru typu Orbitrap Q Exactive: kvadrupól (modrá), C-trap (zelená), vysoko-energetická kolizní cela (HCD) (červená), orbitrap analyzátor (fialová). [148]

Základním kvalitativním módem pro získání komplexních informací o analyzovaném vzorku je **úplný sken** (MS sken). Při volbě tohoto skenu je možné zvolit rozsah m/z hodnot, které budou filtrovány kvadrupólem. Při měření je z funkce úplně vyřazena vysokofrekvenční kolizní cela (HCD, higher-energy collision dissociation cell) a výsledný záznam je tedy pouze záznamem MS¹. [148]

Druhým nejčastěji používaným módem je **úplný MS sken následovaný fragmentací všech iontů** (MS sken/AIF). V tomto módu jsou nepřetržitě zaznamenávány dva různé MS skeny. V prvním jsou analyzované ionty transportovány přímo do orbitrapu. Ve druhém (AIF, fragmentace všech iontů) jsou ionty přeneseny do

vysokoenergetické kolizní cely, kde dochází k jejich fragmentaci. Po fragmentaci se produktové ionty vracejí do C-trapu a jsou injektovány do orbitrapu. První sken se tedy skládá pouze z prekurzorových iontů, zatímco druhý sken obsahuje produktové ionty, které vznikly fragmentací z prekurzorových iontů. ^[148]

Pro kvalitativní stanovení je možné využít i **cíleného monitorování jednoho vybraného iontu** (t-SIM, targeted single ion monitoring). V tomto cíleném módu je dle specifikací operátora (inclusion list) na kvadrupólu nastaven velmi úzký rozsah m/z (v desetínách až jednotkách Daltonů). Odpovídající ionty jsou následně dávkovány do orbitrapu, kde dochází k jejich separaci. ^[148]

Varietou t-SIM, která umožňuje MS/MS fragmentaci je mód označovaný jako **monitorování paralelní reakce** (PRM, Parallel reaction monitoring). Kvadrupól v tomto uspořádání slouží opět jako hmotnostní filtr pro úzký rozsah vybraných m/z . Vybrané ionty jsou následně přeneseny do kolizní cely, kde dojde k jejich fragmentaci a pomocí C-trapu jsou fragmenty dále nadávkovány do orbitrapu, kde dojde k jejich analýze. Režim PRM principiálně odpovídá skenu produktových iontů v uspořádání trojitého kvadrupólu s tím rozdílem, že PRM mód poskytuje výrazně vyšší selektivitu a citlivost detekce. Tento mód je s ohledem na dosažení maximální selektivity nejčastěji využíván při analýzách velmi komplexních vzorků. ^[148]

Dalším z fragmentačních módů je **úplný MS sken následovaný datově závislou fragmentační analýzou** (Full MS/dd-MS²). MS sken je v tomto módu následován sadou uživatelem definovaných datově závislých skenů produktových iontů. V tomto uspořádání přístroj změří jeden úplný sken, a poté analyzuje spektrální informace dle uživatelem definovaného cílového seznamu. Na základě analýzy pak kvadrupól vybírá uživatelem definované ionty (přesné m/z) a posouvá tyto ionty do fragmentační cely. Další postup analýzy fragmentů je obdobný jako u výše uvedených módů. Datově závislé fragmentační analýze (dd-MS²) může být namísto úplného MS skenu rovněž předřazeno cílené monitorování vybraného iontu (SIM/dd-MS²). ^[148]

Dalšími módy, které mohou být použity v některých speciálních aplikacích je sken neutrálních ztrát (NL/dd-MS²), datově nezávislá analýza (DIA, data independent analysis) a multiplexování (Multiplexing). Jednotlivé uvedené módy je možné mezi sebou také kombinovat. ^[148]

2.4.2.3 Detektory

Nejběžnějším typem využívaným pro detekci iontů je elektronový násobič, kdy ionty dopadající na povrch dynody vyrazí elektrony, které jsou následně zesíleny systémem dynod. Alternativou je Faradayův pohár, kde dopadající ionty narážejí na povrch dynody, která indukuje proud a ten je následně zesílen a zaznamenán. Detektory iontů používají všechny analyzátoři s výjimkou analyzátorů využívajících Fourierovou transformaci, kde detekce probíhá jako indukce proudu přímo na stěnách analyzátoru.

[128]

2.4.2.4 Spojení MS se separačními technikami

Před hmotnostní spektrometr bývá velmi často zařazena některá z chromatografických separačních metod, jako je tenkovrstvá, plynová, kapalinová nebo superkritická chromatografie. Tímto spojením vzniká instrumentace umožňující separaci a identifikaci analytů v rámci jediné analýzy. Alternativou může být chromatografická separace a následné off-line měření hmotnostních spekter.

Předřazení plynové chromatografie (GC-MS) je s ohledem na plynné skupenství mobilní fáze a následujícím převodem analytů na ionty technicky nejjednodušší variantou, avšak vzhledem k univerzálnosti HPLC instrumentace je nyní nejčastější variantou spojení HPLC-MS. V případě využití MS detekce následující po HPLC separaci je nutné používat těkavá rozpouštědla a aditiva s adekvátní čistotou. Složení, výsledné pH a koncentrace aditiv v MF bývají v rámci vývoje nové metody důsledně optimalizovány. Při volbě vhodného rozpouštědla a aditiva v MF bývá nutno přistoupit k určitému kompromisu, jelikož musí zaručit nejen dobrou separaci látek, ale současně nesmí negativně ovlivnit ionizaci a snížit citlivost detekce. Při některých bioanalytických aplikacích je díky schopnosti MS detekce rozlišit ionty dle m/z možné tolerovat i nedostatečnou HPLC separaci. [149]

2.5. Specifika analýzy biologického materiálu

Analýza biologického materiálu má svá specifika především z důvodu nízké koncentrace stanovovaných analytů a vysokých koncentrací balastních látek ve stanovovaném biologickém materiálu.

2.5.1 Úprava vzorku před analýzou

Prvním specifikem je tedy úprava vzorku před analýzou. Cílem této úpravy je získat vzorek, který obsahuje co nejméně interferujících látek a je kompatibilní s danou analytickou metodou. Úprava vzorku je obecně jeden z velmi důležitých kroků pro získání kvalitních a kompletních HPLC-MS dat, který v řadě bioanalytických aplikací nelze vynechat. Základními postupy úpravy vzorku v bioanalýze je precipitace proteinů, extrakce z kapaliny do kapaliny a extrakce na pevnou fázi. Další modernější a aplikovanější metody jako je například disperzní mikroextrakce, extrakce pomocí dutého vlákna, elektromembránová extrakce apod. vycházejí převážně z těchto třech základních metod. [129,150–156]

Precipitace proteinů může být dosaženo zejména pomocí přidavku organických rozpouštědel (methanol, acetonitril, aceton, apod.), dále pak přidavkem silných kyselin (triflouroctová, trichloroctová, chloristá, apod.), solí těžkých kovů (síran zinečnatý, síran měďnatý, apod.), případně kombinací výše uvedených metod. Precipitace je rychlou, snadnou a poměrně efektivní metodou úpravy vzorků. Bohužel při ní nedochází k odstranění dalších endogenních látek. Část analytu může být také z důvodu vazby na precipitát ztracena a dochází při ní k naředění vzorku. [112,157,158]

Více robustním, selektivním, ale pro operátora náročnějším přístupem je pak extrakce z kapaliny do kapaliny využívající přenosu (extrakce) rozpuštěných analytů ze vzorku do jiné nemísitelné kapaliny označované jako extrakční činidlo. Jako extrakční činidla bývají využívána nejčastěji organická rozpouštědla, jako např. ethylacetát, methylethylketon, chloroform, dichlormethan, n-hexan apod. [159] V bioanalýze nachází své uplatnění i extrakce na tuhou fázi, která využívá pro retenci analytů stejné nebo podobné materiály jako stacionární fáze v HPLC. [129,150,157,158]

2.5.2 Instrumentace

Druhým specifikem je volba adekvátní instrumentace a nastavení parametrů metody. Následující text se bude vzhledem k tématickému zaměření disertační práce zabývat aplikací HPLC-MS instrumentace ve vývoji léčiv.

V bioanalytických aplikacích je v oblasti HPLC vždy nutné dobře zvážit a vybrat typ stacionární fáze s ohledem na co nejlepší selektivitu pro stanovované analyty. Velmi

často zde bývá využívána gradientová eluce a reverzní mód separace. Gradientová eluce umožňuje efektivní analýzu i velmi odlišných analytů z pohledu polarity. Reverzní mód je vhodný z pohledu rozpustnosti vzorku a je zároveň většinou dobře kompatibilní s hmotnostně spektrometrickou detekcí, která velmi často následuje vzhledem ke svojí citlivosti a možnosti identifikace molekul. Pro ionizaci analytů bývá nejčastěji využívána ionizace elektrosprejem nebo chemická ionizace za atmosférického tlaku. Většina stanovovaných molekul obsahuje ve své struktuře dusík, a proto je volen pozitivní mód ionizace. Při kvantifikaci analytů je nutné zohlednit potenciálně vyskytující se matricové efekty, proto je nejčastěji využívána kalibrační metoda s přidavkem interního standardu.

[129]

3 CÍLE PRÁCE

- Ověření totožnosti pomocí HRMS, stanovení HPLC-UV čistoty a studium schopnosti prostupu přes potkaní hematoencefalickou bariéru u nově syntetizovaných derivátů 7-Meoty (látky K1572-K1601) a u nově syntetizované látky 7-Feoty.
- Vývoj vysoce-selektivní HPLC-HRMS metody pro identifikace a relativní kvantifikace metabolitů I. fáze *in vitro* biotransformace takrinu, 7-Meoty, 7-Feoty a 6-chlortakrinu na modelu lidských jaterních mikrosomů.
- Studium metabolizace takrinu, 7-Meoty a 7-Feoty na modelu potkaních a lidských primárních hepatocytů a porovnání metabolického profilu takrinu mezi modelem lidských jaterních mikrosomů a vybranými zvířecími jaterními mikrosomy.
- Porovnání toxicity takrinu, 7-Meoty, 7-Feoty a 7-hydroxytakrinu na modelu CHO-K1 buněk, potkaních jaterních řezů a potkaních a lidských primárních hepatocytů.
- Ověření hypotézy možného toxického působení takrinových derivátů prostřednictvím chinon methidu díky metabolizaci: takrinový derivát → 7-OH-takrin → chinon methid → SH-adenylylační produkty s proteiny/glutathionem.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACÍM

4.1 Úvod do problematiky takrinové toxicity

Předkládaná disertační práce se primárně zabývá studiem takrinu a jeho vybraných strukturních analogů, jakožto potenciálních kandidátů na léčiva využitelná v terapii Alzheimerovy choroby. Alzheimerova nemoc je nevyléčitelné onemocnění, které je pátou nejčastější příčinou lidské smrti. Primárním důvodem této nelichotivé statistiky je nedostatečně objasněná patogeneze a etiopatofyziologie tohoto onemocnění v kombinaci s nedostatečně pokrytou léčbou. V terapii je v současné době možné využít pouze omezené množství symptomaticky působících léčiv, jako jsou inhibitory AChE donepezil, rivastigmin a galantamin a inhibitor NMDA receptorů memantin. ^[4–6,11]

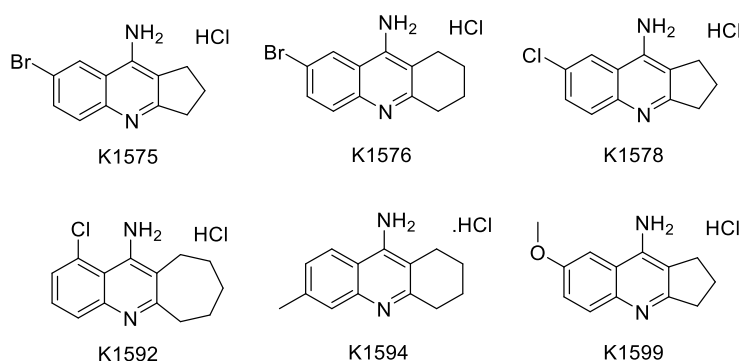
Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin) je první molekulou ze skupiny inhibitorů AChE, které byla v roce 1993 uvedena do klinického užití, avšak v roce 2013 musela být stažena z důvodu vyskytujících se nežádoucích účinků. Primárně se jednalo o hepatotoxické působení jeho metabolitu 7-hydroxytakrinu v játrech, který je považován za prekursor velmi reaktivní molekuly chinon methidu. Navrhovaným mechanismem toxicity je interakce chinon methidu s volnými thiolovými skupinami glutathionu a hepatocytárních proteinů za vzniku chinon methidových SH- aduktů (Obrázek 1). Z důvodu zamezení tvorby těchto toxických molekul bylo přistoupeno k zavedení různých chemických funkčních skupin blokujících problematickou polohu 7-na takrinovém skeletu, za vzniku 7-Meoty, 7-Feoty a dalších derivátů. ^[31,55,58,59,62,75,77,83]

4.2 Nadějně deriváty takrinu a 7-methoxytakrinu

Jednou z možných chemických obměn struktury takrinu, která potenciálně může zabránit tvorbě toxického chinon methidu, je zavedení methoxy skupiny do polohy 7- na tetrahydro-akridinovém jádře za vzniku 7-Meoty. Charakterizace této molekuly je podrobněji popsána v kapitole 2.2.2.2.1 Vybrané substituované deriváty takrinu.

Podobně jako u 7-Meoty a takrinu byl prokázán duální mechanismus účinku i u skupiny třiceti derivátů takrinu a 7-Meoty, u kterých byly provedeny různé modifikace

základní struktury (kódové označením K1572-K1601, **Příloha 1**). Primárně se u těchto látek jedná o změnu v četnosti cyklu nearomatické části takrinového jádra v kombinaci se substitucí pomocí halogenů nebo methylové skupiny v aromatické části molekuly. Z této skupiny derivátů bylo na základě míry inhibice AchE a schopnosti blokovat NMDA receptory vybráno 6 nejlepších látek (**Obrázek 7**). Jelikož se jedná o látky cílící svým mechanismem účinku na CNS, byla u nich experimentálně stanovena rovněž jejich schopnost přestupovat přes HEB a monitorovány potenciální nežádoucí psychomimetické účinky.



Obrázek 7: Chemické struktury vybraných látek pro další testování.

Schopnost látek přestupovat HEB byla nejdříve testována *in vitro* na buněčném modelu MDCK buněk, kde na základě výpočtu koeficientu zdánlivé propustnosti (PaPP, Apparent permeability coefficient) bylo stanoveno, že u všech šesti vybraných látek je predikována dobrá dostupnost v CNS. Tato predikce byla následně potvrzena na *in vivo* modelu laboratorních myší. Dospělým jedincům byla intraperitoneálně aplikovaná dávka 5 mg/kg testované látky a v intervalech 15 a 60 minut jim byla odebrána plasmata a mozek pro stanovení koncentrací testovaných látek. Mozky byly následně homogenizovány a společně s plasmou skladovány při teplotě -80°C .

Pro stanovení koncentrací látek byla zvolena technika HPLC-MS a jelikož se jedná o stanovení koncentrace v biologických vzorcích, bylo před analýzou reálných vzorků nutné vybrat a optimalizovat vhodnou metodu úpravy vzorku. V rámci hledání metody s nejvyšší výtěžností (recovery) byla testovaná sada třinácti extrakčních činidel a dvou precipitačních činidel (**Tabulka 1**). Testování probíhalo tak, že 160 μl plasmata bylo smícháno se 40 μl roztoku testované látky v DMSO ($c = 1 \text{ mg/ml}$) a přidáno 100 μl 5M NaOH. Dále bylo přidáno 1000 μl testovaného extrakčního činidla a inkubováno na třepačce (10 min, 1200 RPM). Extrakční směs byla následně centrifugována (5 min,

12 000 RPM), bylo odebráno 700 μ l supernatantu a odpařeno na vakuové odparce do sucha. Odpařené vzorky byly následně rekonstituovány ve 100 μ l 50% acetonitrilu a následně analyzovány. Porovnání výtěžnosti (recovery) testované látky za využití různých činidel probíhalo z důvodu potenciálně možných interakcí u každé látky samostatně (Tabulka 1). Jako činidla s nejvyšší výtěžností se dle naměřené intenzity signálu jevil ethylacetát, 2-methyl-tetrahydrofuran a methylethylketon. Na základě získaných výsledků a faktu, že ethylacetát byl experimentálně stanoven jako nejvhodnější extrakční činidlo i pro takrin, 7-Meotu a takrin-trolox hybridní molekuly, byla jako finální a nejuniverzálnější úprava vzorků před analýzou zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny právě za využití ethylacetátu.

Analýza byla provedena na přístroji Dionex Ultimate 3000 UHPLC připojeném ke Q Exactive Orbitrap Plus hmotnostnímu spektrometru. Pro analýzu byla použita 5,5 minutová gradientová metoda a kolona Luna Omega Polar C18 (2,1 \times 50 mm, 1,6 μ m). MF byla složena z vody s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí (v/v) (složka A) a acetonitrilu rovněž s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí (v/v) (složka B). Pro kvantifikaci byla sestrojena kalibrační přímka v rozsahu 0,5 nM - 50 μ M a jako vnitřní standard pro kvantifikaci byl zvolen 7-Feota, jakožto strukturně podobná a lipofilnější látka.

Tabulka 1: Testování výtěžnosti za použití různých extrakčních a precipitačních činidel.

činidlo	K1575	K1576	K1578	K1592	K1594	K1599
ethylacetát	1,59E+08	1,37E+08	2,58E+08	3,71E+05	4,19E+08	4,20E+08
tetrahydrofuran	1,20E+08	1,29E+08	2,41E+08	3,44E+05	3,57E+08	3,20E+08
dichlormethan	9,92E+07	5,26E+07	1,81E+08	2,06E+05	2,63E+08	2,90E+08
2-methyl-tetrahydrofuran	1,32E+08	1,29E+08	2,53E+08	4,93E+05	4,53E+08	3,82E+08
n-heptan	9,25E+07	9,36E+07	1,65E+08	2,96E+05	2,87E+08	6.35 E7
methyl tert-butyl ether	1,28E+08	9,78E+07	2,27E+08	3,84E+05	3,72E+08	3,43E+08
2-butanol	1,14E+08	1,03E+08	2,08E+08	3,68E+05	3,46E+08	3,50E+08
methylethylketon	1,57E+08	1,30E+08	2,97E+08	4,14E+05	4,22E+08	4,36E+08
4-methyl-2-pentanon	1,16E+08	8,54E+07	2,29E+08	3,09E+05	4,19E+08	3,94E+08
1-pentanol	6,29E+07	5,06E+07	1,27E+08	1,81E+05	2,00E+08	2,20E+08
chloroform	1,39E+08	1,24E+08	2,34E+08	3,94E+05	4,10E+08	3,95E+08
hexan	8,66E+07	9,54E+07	1,09E+08	3,43E+05	2,77E+08	5,94E+07
1-butanol	7,06E+03	5,19E+04	pod E4	1,25E+03	3,81E+03	1,15E+03
acetonitril	1,25E+07	1,10E+07	2,04E+07	3,50E+04	2,99E+07	2,87E+07
aceton	2,85E+07	3,09E+07	3,41E+07	6,98E+04	1,27E+08	1,32E+08

Ze stanovených koncentrací látek v plasmě a mozku (**Příloha 1, Tabulka 3**) je na modelu laboratorní myši patrné, že všech šest testovaných látek je schopno prostupovat snadno přes HEB (interval 15 minut) avšak jejich koncentrace v mozku v čase poměrně rychle klesá (interval 60 minut), což naznačuje jejich pravděpodobně rychlou eliminaci z centrální nervové soustavy.

Z pohledu nežádoucích účinků neměly vybrané testované látky žádný zásadní psychomimetický efekt. Jediným pozorovaným nežádoucím efektem bylo snížení pohybové aktivity testovaných myší při aplikaci vyšších dávek látek K1575, K1576, K1578, K1592 a K1599.

Na základě prokázaného duální působení a schopnosti prostupovat přes HEB v kombinaci s dobrými pilotními výsledky behaviorálních studií lze vybrané studované deriváty zařadit mezi nadějně kandidáty pro vývoj nových léčiv v terapii AN.

4.3 Charakteristika molekuly 7-fenoxytakrinu

Studiem dalšího nadějněho derivátu takrinu substituovanému v poloze 7-, 7-Feoty, se zabývá druhá z přiložených publikací (**Příloha 2**). 7-Feota byla poprvé připravena v roce 2020 pomocí 3-krokové chemické syntézy na Katedře toxikologie a vojenské farmacie na Fakultě vojenského zdravotnictví při Univerzitě Obrany. Počátečním krokem syntézy je cyklokondenzace 4-fenoxyanilinu s 2-oxocyklohexan-1-karboxylátem za vzniku 7-fenoxy-1,2,3,4,9,10-hexahydroakridin-9-onu, který je následně substituován molekulou chlóru v pozici 9. Finálním krokem je zavedení primární aminoskupiny nukleofilní substitucí za vzniku 7-fenoxytakrinu. ^[83]

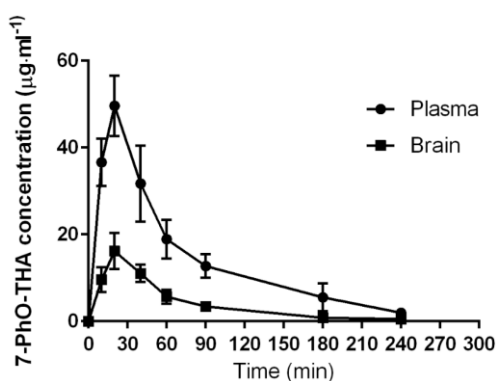
Totožnost molekuly 7-fenotyakrinu byla stanovena pomocí HPLC-HRMS instrumentace. Pro analýzu byla využita 7,5 minutová gradientová metoda na koloně Kinetex C18 EVO (Phenomenex) s mobilní fází složenou z vodné a acetonitrilové složky [obě okyselené pomocí 0,1% kyseliny mravenčí (v/v)]. Stanovená hodnota $m/z=292,1324$ byla naměřena s odchylkou 10 ppm od teoretické hodnoty ($m/z=292,1293$). Dále byla pomocí HPLC-UV metody stanovena čistota 7-fenoxytakrinu, která byla při vlnové délce 254 nm vypočtena na 95,4%. ^[83]

Rovněž u 7-Feoty byl pozorován duální účinek. Její inhibiční aktivita na enzym AChE byla modifikovanou Ellmanovou metodou stanovena jako dostatečná ($IC_{50}=2,4 \mu M$).

Naměřená hodnota byla přibližně 6x nižší než v případě 7-Meoty ($IC_{50}=15,0 \mu M$) a 2x nižší než u klinicky užívaného rivastigminu ($IC_{50}= 4,5 \mu M$). Na druhou stranu donepezil vykazuje aktivitu proti AChE o tři řády vyšší ($IC_{50} = 0,023 \mu M$). Na základě analýzy bodových mutací byla při testování schopnosti blokace NMDA receptorů u 7-Feoty na rozdíl od dalších takrinových analogů stanovena unikátní schopnost vázat se do ifen-prodilového vazebného místa a selektivně tak blokovat GluN2B podjednotku. Tato schopnost řadí 7-Feotu mezi nadějně kandidáty na posun do dalších fází vývoje.

Dále byla u této molekuly studována *in vivo* farmakokinetika. Jako animální model byli pro studii využiti potkani z outbradního kmene Wistar, kterým byla intraperitoneálně aplikována dávka 24 mg/kg. Potkani byli následně usmrceni v devíti časových intervalech (0, 10, 20, 40, 60, 90, 180, 240 a 1440 minut) a byla jim odebrána krev a mozek. Po separaci krevní plasmy a homogenizaci mozkové tkáně byla provedena extrakce 7-Feoty pomocí dichlormethanu. Následná analýza a kvantifikace 7-Feoty byla provedena na obdobné instrumentaci, jako tomu bylo v případě látek K1572-K1601. Jako stacionární fáze byla využita Kinetex C18 (3,0 × 150 mm, 2,6 μm ; Phenomenex) a jako vnitřní standard byl před extrakcí přidáván 6-Cl-takrin.

Maximální koncentrace 7-Feoty v mozku i plasmě bylo dosaženo v čase dvaceti minut od podání a poločas látky byl vypočten v plasmě na 54 minut a v mozku na 51 minut (Obrázek 8). Z farmakokinetických křivek je tedy patrné, že látka dobře a poměrně rychle prostupuje do mozkové tkáně, ve které je na rozdíl do plasmy detekovatelná i po 24 hodinách.



Obrázek 8: Farmakokinetické křivky 7-Feoty v potkaní plasmě a mozku (Příloha 2).

U 7-Feoty byl na potkaním modelu studován také její potenciální neuroprotektivní efekt. Jako model byly využity NMDA indukované hipokampální léze u potkana Wistar způsobující excitotoxicitu. V rámci studie byla u 7-Feoty prokázána schopnost redukce

tvorby hipokampálních lézí a při porovnání jejího neuroprotektivního efektu s klinicky užívaným memantinem byl stanoven tento efekt jako velmi dobrý. Navíc v rámci potkaních behaviorálních testů byla prokázána i schopnost 7-Feoty snižovat uměle vyvolanou hyperlokomoci (**Příloha 2**). Všechny výsledky získané ve studii činí ze 7-Feoty velmi nadějnou molekulu pro další testování a potenciální využití v terapii Alzheimerovy nemoci.

4.4 Hodnocení biotransformace takrinu a jeho vybraných derivátů

Jak již bylo zmíněno výše za hlavní příčinu takrinové toxicity je považována jeho metabolizace na 7-hydroxytakrin s následným vznikem biologicky vysoce reaktivního chinon methidu. V přechozích studiích byly částečně popsány a charakterizovány některé mono- a di-hydroxy metabolity takrinu a 7-Meoty za využití metod HPLC, ^[58,77] HPLC-MS, ^[62] TLC ^[160] nebo kapilární zónové elektroforézy ^[161]. Žádná z těchto metod však necharakterizuje kompletní spektrum metabolitů takrinu a 7-Meoty, jelikož nejsou dostatečně selektivní nebo citlivé. Jedním z důvodů, proč tomu tak je, může být i období, kdy byly metody pro monitoring metabolizace takrinových molekul vyvíjeny, jelikož většina z publikovaných metod pochází z období do roku 2000. ^[58,62,77,160,161] Vzhledem k poměrně velkému progresu v oblasti HPLC-MS v posledních třiceti letech bylo našim cílem vyvinout a optimalizovat novou vysoce selektivní HPLC-MS/MS metodu, která by sloužila jako nástroj pro kompletní charakterizaci metabolizace takrinu a jeho derivátů, a tedy i k následné predikci potenciální biotransformační toxicity u nově vyvíjených látek ze skupiny takrinu (**Příloha 3**).

Jako parentní struktury pro vývoj metody byly vybrány takrin a jeho tři deriváty [7-Meota, 7-Feota a 6-Cl-takrin (**Obrázek 2**)], které jsou substituovány přímo nebo v bezprostřední blízkosti k biotransformačně problematické pozici 7- na takrinovém jádře. Jako základní *in vitro* testovací model biotransformace byly zvoleny lidské jaterní mikrosomy (HLM, Human liver microsomes). Pro hodnocení biotransformace byla využita kombinace UHPLC Dionex Ultimate 3000 s Q Exactive Orbitrap Plus hmotnostním spektrometrem.

Při vývoji analytické metody byly s cílem získat co nejlepší selektivitu pro vznikající metabolity testovány různé typy stacionárních fází. Pro porovnání selektivity byly za

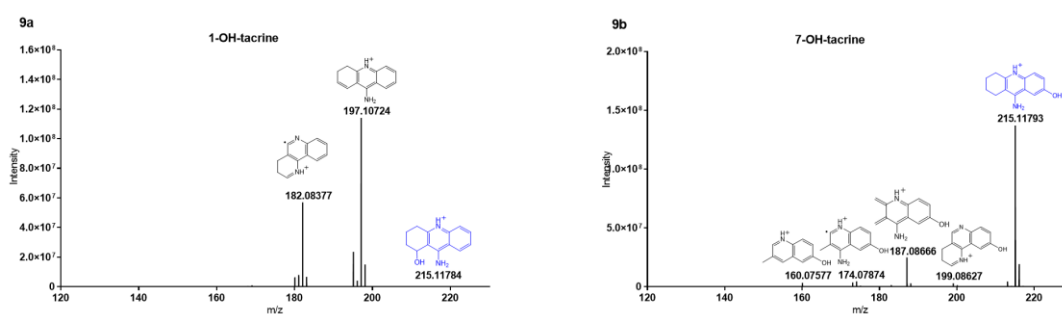
stejných chromatografických podmínek analyzovány vzorky na koloně Kinetex C18, Kinetex Polar C18 a Kinetex EVO. Vzhledem k přítomnosti aromatických jader na takrinovém skeletu byla mezi testované SF zařazena také kolona Kinetex PFP. Z extrahovaných iontových chromatogramů metabolitů takrinu a jeho třech derivátů plyne, že nejvyšší retence a výrazně lepší selektivity pro mono- a di-hydroxy metabolity bylo dosaženo při použití PFP SF. Pravděpodobně je tomu tak díky silným π - π interakcím. Na základě tohoto výsledku, byly testovány tři další kolony obsahující fenylové nebo pentafluorofenylové skupiny (Kinetex Phenyl-Hexyl, Kinetex Bifenyl a ACE EXCEL C18-PFP). Bohužel selektivita na bifenylové a fenyl-hexylové koloně byla pro vznikající metabolity výrazně horší v porovnání s Kinetex-PFP. Na druhé straně nejlepší selektivita pro monohydroxylované metabolity byla stanovena na koloně ACE Excel C18-PFP. Nicméně tato kolona nebyla schopna separovat dihydroxylované metabolity. Jako kompromis pro analýzu parentních látek a jejich mono- a dihydroxylovaných metabolitů byla tedy finálně zvolena kolona Kinetex PFP.

Dále bylo v rámci vývoje metody optimalizováno složení mobilní fáze. Jelikož požadavek byl nejen schopnost separovat analyty s relativně odlišnou polaritou, ale zároveň i umožnění identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie, bylo přistoupeno ke gradientové eluci v reverzním módu. Testována byla tři odlišná složení mobilní fáze, kde nejlepší citlivosti a selektivity bylo dosaženo při využití vody a acetonitrilu s přídavkem 0,1% kyseliny mravenčí (v/v). Následně byl testován vliv koncentrace kyseliny mravenčí v MF v rozsahu 0,02 - 0,2 %. Nejvyšší selektivity a citlivosti pro vznikající metabolity bylo dosaženo při použití vody s přídavkem 0,05 % kyseliny mravenčí (v/v) (složka A) a acetonitrilu rovněž s přídavkem 0,05 % kyseliny mravenčí (v/v) (složka B). HPLC-MS/MS analýza metabolitů jedné látky trvala 25 min.

V průběhu vývoje metody bylo rovněž pozorováno, že důležitou roli při separaci metabolitů hraje nejen zvolený typ SF, ale i nastavení teploty. Například při analýze takrinových dihydroxymetabolitů bylo lepší separace dosaženo při 15°C, avšak pro většinu metabolitů byla optimální teplotou separace teplota 40°C, které byla zvolena jako finální kompromis.

Nově vyvinutá HPLC-MS/MS metoda umožnila selektivně separovat a určit pozici hydroxylace na takrinovém jádře u vznikajících mono- a di-hydroxylovaných metabolitů takrinu a jeho třech derivátů. Navrhovaná pozice hydroxylové skupiny vychází

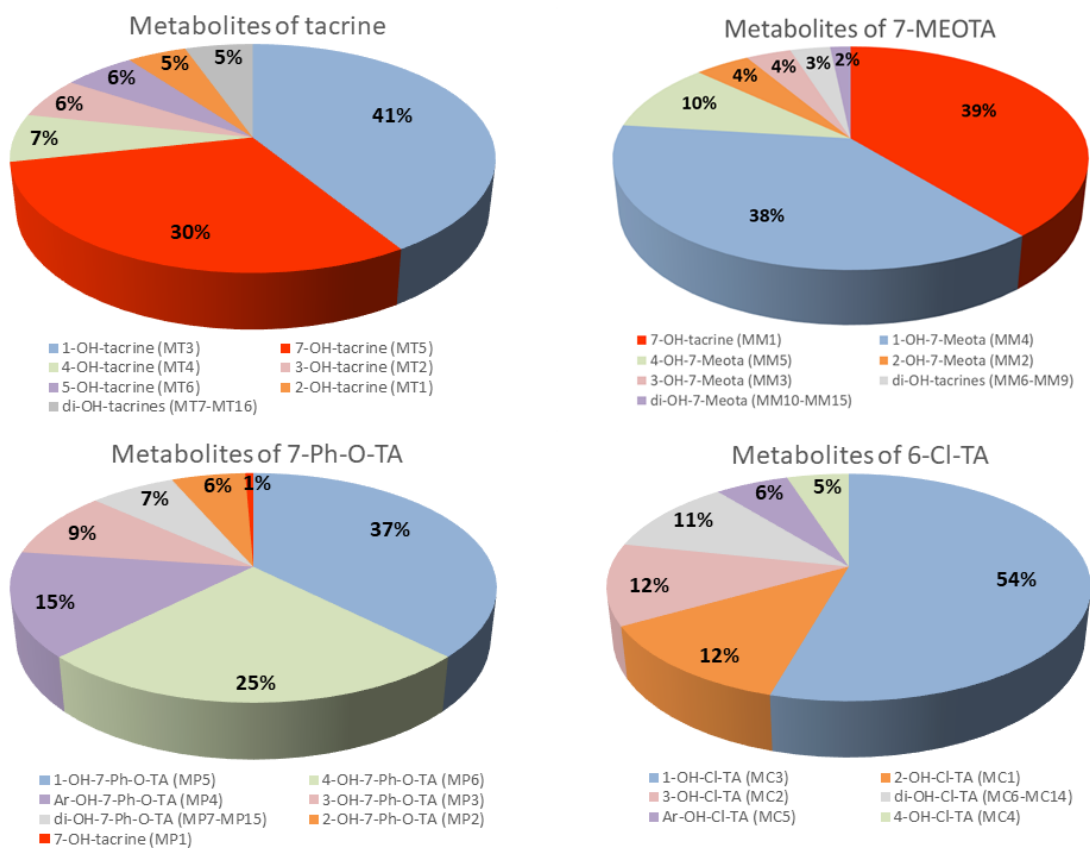
z retenčního chování metabolitů, stability prekurzorových iontů a přítomnosti specifických fragmentů v MS/MS spektrech. Díky vznikajícím fragmentům v PRM MS/MS módu bylo možné určit, zda k hydroxylaci došlo v aromatické nebo v nearomatické části molekuly (**Obrázek 9**). Stabilita aromatické hydroxy skupiny byla u fragmentů výrazně vyšší než stabilita nearomatické hydroxyskupiny. U některých navržených metabolitů byla jejich struktura následně finálně potvrzena pomocí analýzy syntetických standardů (**Příloha 3**).



Obrázek 9: Fragmentační spektra vybraných metabolitů s nearomatickou (**9a**) a aromatickou (**9b**) hydroxylací (**Příloha 3**).

Pomocí nově vyvinuté HPLC-MS/MS metody bylo možné po HLM inkubaci separovat 16 metabolitů takrinu a 15 metabolitů 7-Meoty, z nichž 4 metabolity (3-OH-takrin, 5-OH-takrin, 2-OH-Meota a 3-OH-Meota) byly separované a charakterizované poprvé. Při studiu metabolitů 7-Feoty a 6-Cl-takrinu bylo identifikováno 15, respektive 14 metabolitů. V případě těchto dvou látek se jedná o první studii, ve které byly metabolity charakterizovány (**Příloha 3, Obrázky 6-8**). Primární cestou metabolizace všech čtyř testovaných takrinových molekul byla jejich monohydroxylace, doplněná marginální tvorbou dihydroxymetabolitů. U všech testovaných látek byly identifikované obdobné pozice hydroxylace a na závěr studie byla porovnána i relativní kvantita jednotlivých vznikajících metabolitů (**Obrázek 10**). Z koláčových grafů je patrné, že k nejvíce relativně zastoupeným monohydroxylovaným metabolitům patřil u všech molekul 1-hydroxy metabolit. S ohledem na teorii, že příčinou hepatotoxicity takrinu je metabolická přeměna 7-hydroxytakrinu na chinon methid, byla u jednotlivých derivátů věnována pozornost vzniku právě tohoto metabolitu. V případě takrinu tvořil 30 % z celkového množství metabolitů. Ze získaných dat je patrné, že cílená substituce methoxy skupinou do polohy 7- takrinového skeletu (7-Meota) bohužel vedla

k procentuálně vyšší tvorbě 7-hydroxytakrinu (39 %) v porovnání s takrinem (30 %). V absolutním množství je produkce 7-hydroxytakrinu u obou molekul na stejné úrovni. Naopak tomu bylo v případě 7-Feoty, kdy došlo k redukci tvorby na pouhé 1 % a v případě 6-Cl-takrinu nevznikl 7-hydroxytakrin vůbec (Obrázek 10). Tyto výsledky byly rovněž potvrzeny porovnáním absolutního množství vznikajícího 7-hydroxytakrinu. (Příloha 3, Obrázek S16).



Obrázek 10: Relativní zastoupení metabolitů po inkubaci s HLM (Příloha 3, obr. 9). Jednotlivé barvy reprezentují metabolizaci ve stejné poloze takrinového jádra (např. modrá barva odpovídá metabolizace v poloze 1 apod.).

Díky aplikaci nově vyvinuté selektivní HPLC-MS/MS metody bylo prokázáno, že specifické strukturální modifikace takrinového jádra (7-phenoxy a 6-chloro) mohou vést k zásadnímu snížení tvorby metabolitu 7-hydroxytakrinu, jakožto prekurzoru toxického chinon methidu. Vyvinutou HPLC-MS/MS metodu je možné s ohledem na její schopnost separovat a identifikovat metabolity takrinu aplikovat nejen na jeho tři studované deriváty 7-Meotu, 7-Feotu, 6-Cl-takrin, ale také na další takrinové strukturální analogy s potenciálním rizikem tvorby 7-hydroxytakrinu.

V další fázi studie byla vyvinutá HPLC-MS/MS metoda využita rovněž pro porovnání lidského a animálního metabolického profilu takrinu s cílem nalézt vhodný animální model, který by nejlépe odpovídal lidskému modelu. Pro studium byly využity nejprve *in vitro* modely lidských, myších, potkaních a miniprasečích jaterních mikrosomů (**Příloha 4, Obrázek 2**). Ze získaných biotransformačních dat je patrné, že myší model je člověku nejpodobnější. Následně byly studovány modely primární hepatocytů, případně jaterních řezů, na kterých byly potvrzeny výsledky získané na *in vitro* mikrosomálních modelech (**Příloha 4, Obrázek 3**). Jako úprava vzorku před analýzou byla stejně jako u látek K1572-K1601 zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny za využití ethylacetátu z důvodu nejvyšší výtěžnosti v porovnání s ostatními testovanými extrakčními činidly.

Z dat získaných v rámci disertační práce plyne, že by s ohledem na hypotézu toxického působení chinon methidu bylo vhodné monitorovat vznikající metabolity u všech nově vyvíjených takrinových derivátů. K tomuto účelu by pro základní monitoring metabolitů mohla sloužit a být využita námi nově vyvinutá HPLC-MS/MS metoda.

4.5 Studium toxicity takrinu a jeho vybraných derivátů

Se studiem biotransformace je u takrinových molekul velmi úzce propojena i oblast (hepato)toxicity. V rámci naší studie byla porovnána toxicita 4 molekul (takrin, 7-Meota, 7-Feota, 7-hydroxytakrin) na čtyřech různých modelech, a to na CHO buňkách (Chinese Hamster Ovary, buňky vaječnicků samice čínské křečka), potkaních a lidských primárních hepatocytech a na potkaních jaterních řezech. I přes to, že 7-Feota produkuje nejmenší množství 7-hydroxytakrinu, jakožto prekurzoru toxicky působícího chinon methidu, byla u ní pozorována nejvyšší toxicita mezi testovanými molekulami na všech modelech (**Příloha 4, Tabulka 1**). Jelikož mají testované molekuly odlišnou lipofilitu, a tedy i odlišnou schopnost prostupovat do intracelulárního prostoru, byly v rámci následných experimentů upraveny vstupní dávky takrinových derivátů tak, aby bylo dosaženo stejných koncentračních hladin testovaných látek v intracelulárním prostoru. Avšak i po této úpravě dávek, byla stále u molekuly 7-Feoty pozorována nejvyšší toxicita. Získané výsledky tak indikují, že hlavním viníkem hepatocelulární toxicity takrinových

derivátů nemusí být pouze metabolit 7-hydroxytakrin a vyvolávají otázku, zda je teorie chinon methidového působení validní.

Vzhledem k výše uvedeným pozorováním bylo přistoupeno k experimentálnímu ověření metabolického vzniku chinon methidu z takrinu, 7-Meoty, 7-Feoty a 7-hydroxytakrinu (**Příloha 4**). Jelikož chinon methid je ve své aktivní formě vysoce reaktivní molekulou, kterou je velmi obtížné v biologickém prostředí zachytit a následně i analyzovat, byla pro průkaz jeho přítomnosti zvolena jeho detekce ve formě SH- aduktů s cysteinem případně glutathionem. Takrinové deriváty byly tedy inkubovány s HLM za přítomnosti cysteinu a glutathionu s cílem umožnit tvorbu SH- aduktů. V naměřených Full-MS hmotnostních spektrech získaných z analýz inkubačních směsí byla detekována přítomnost aduktů chinon methidem s cysteinem ($m/z = 334.12199$) i s glutathionem ($m/z = 520.18605$). MS odezva cysteinových aduktů byla v porovnání s adukty glutathionu zaznamenána ve vyšší intenzitě o dva až tři řády. Totožnost vznikajících aduktů byla potvrzena na základě identifikace specifických fragmentů v PRM módu.

Výrazně nižší množství SH- aduktů bylo detekováno v případě 7-Feoty, což koresponduje s nejnižším množstvím produkovaného metabolitu 7-hydroxytakrinu. Získané výsledky sice potvrzují vznik chinon methidu a jeho aduktů na modelu HLM, avšak stále nepřináší vysvětlení nejvyšší toxicity 7-Feoty naměřené na mnohem komplexnějším modelu primárních lidských hepatocytů.

Za účelem objasnění této pozorované diskrepance bylo přistoupeno k proteomické analýze lyzátů primárních lidských hepatocytů po inkubaci s takrinem a 7-hydroxytakrinem. Analýza za využití iodo-TMT značení volných SH- skupin neprokázala žádnou přítomnost SH- aduktů na proteinech. Vznikající SH- adukty byly stejným iodo-TMT přístupem naopak potvrzeny v případě metabolizace paracetamolu jakožto pozitivní biologické kontroly. Tato naše pilotní studie toxicity takrinových metabolitů tedy vyvolává otázku, zda je metabolizace 7-hydroxytakrinu na chinon methid jediným mechanismem toxicity takrinových molekul. Tvzení, že by tomu tak nemuselo být, odpovídají získané výsledky testů toxicity, kdy 7-Feota navzdory nízké produkci 7-hydroxytakrinu vykazovala nejvyšší toxicitu. Zároveň bylo na modelu primárních lidských hepatocytů inkubovaných s takrinem a 7-hydroxytakrinem zaznamenáno celkové snížení koncentrace sérového transferinu v porovnání s negativní kontrolou (**Příloha 4**). Pokles sérového transferinu, jakožto specifické transportní

bílkoviny pro železné ionty, byl již v minulosti popsán a propojen s narušenou funkcí jater v případě jaterní cirhózy s následným jaterním selháváním. ^[162] Tento pokles by tedy mohl být potenciálně propojen s odlišným mechanismem takrinové hepatotoxicity. Z našich prvotních proteomických dat však zatím není zcela zřejmé, jakým způsobem souvisí pokles hladin transferinu s hepatotoxickým působením takrinu a zda je tento pokles příčinou nebo spíše důsledkem takrinem způsobené toxicity.

Pro definitivní potvrzení, zda je chinon methidová teorie toxicity jediným mechanismem toxicity takrinových molekul, je však zapotřebí provést další experimenty a měření. Těmto experimentům se v současnosti velmi intenzivně věnuje tým Centra biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, kterého jsem členem, ve spolupráci s Katedrou fyziologie a farmakologie na Karolinska Institutet ve Švédsku.

5 ZÁVĚR

V historii lidstva mělo každé období svůj zásadní zdravotní problém. V průběhu devatenáctého století se jednalo o smrtelná infekční onemocnění, během dvacátého století způsobovaly potíže převážně kardiovaskulární onemocnění, a v první čtvrtině dvacátého prvního století se prozatím jedná o různé formy demencí a pandemií [2]. Nejčastější formou vyskytujících se demencí je AN, která je v současnosti nevyléčitelným onemocněním. Vývoj nových léčiv působících v terapii tohoto onemocnění je tedy velmi žádaný.

Disertační práce je souhrnným komentářem ke čtyřem publikovaným pracím a je zaměřena na studium takrinu a jeho analogů, které je možné zařadit mezi nadějně látky potenciálně směřující k uplatnění v symptomatické terapii AN. Výhodou těchto molekul je prokázaný duální mechanismus účinku a velmi dobrý prostup do CNS. Avšak jako nutné se jeví u těchto molekul studovat jejich biotransformaci a případně zabránit vzniku toxického prekurzoru 7-hydroxytakrinu. Při studiu metabolizace a farmakokinetiky nachází v posledních letech největší uplatnění technika HPLC-MS/MS.

V počáteční studii byla věnována pozornost komplexnímu studiu a HPLC-MS stanovení schopnosti prostupovat přes HEB pro nadějně deriváty takrinu, 7-Meoty a pro 7-Feoty. Díky dvěma nově vyvinutým HPLC-MS metodám byla u molekul K1575, K1576, K1578, K1592, K1594 a K1599 a 7-Feoty potvrzena jejich schopnost dobře prostupovat do CNS. Na základě jejich prokázaného duálního působení v kombinaci s dobrými pilotními výsledky behaviorálních studií na potkanech, lze konstatovat, že tyto molekuly patří mezi nadějně kandidáty na nová léčiva v terapii AN.

Druhá část experimentální práce se zabývala studiem biotransformace a toxicity takrinu a jeho derivátů 7-Meoty, 7-Feoty a 6-Cl-takrinu. Pro studium metabolizace takrinových molekul byla vyvinuta nová vysoce selektivní a citlivá HPLC-MS/MS metoda umožňující separaci a identifikaci vznikajících metabolitů. Primární biotransformační cestou těchto molekul je jejich hydroxylace, kdy nejvíce zastoupeným metabolitem je metabolit hydroxylovaný v pozici 1-. Velmi zajímavých závěrů bylo dosaženo při porovnávání lidských a zvířecích metabolických profilů testovaných látek za využití jaterních mikrosomů a primárních hepatocytů izolovaných z různých organismů. Jelikož potkan jako nejčastěji využívaný animální model neprodukuje odpovídající množství 7-hydroxytakrinu, byl jako člověku biotransformačně nejvíce podobný animální model

vyhodnocen model laboratorní myši. Jako obecně nejvhodnější *in vitro* model pro charakterizaci biotransformace takrinových derivátů se jeví model lidských primárních hepatocytů (3D sféroidy).

Díky aplikaci nově vyvinuté HPLC-HRMS metody bylo zjištěno, že 7-Feota tvoří po inkubaci s HLM pouze stopové množství 7-hydroxytakrinu a že 6-chlortakrin tento metabolický prekurzor toxického působení netvoří vůbec. Z toxikologického pohledu by tedy u těchto derivátů neměla ze 7-hydroxytakrinu vznikat reaktivní molekula chinon methidu a mělo by se jednat o molekuly s nižší toxicitou. Tato predikce však nebyla v rámci našich *in vitro* experimentů potvrzena. Z hlediska toxicity byla navíc získána analytická a proteomická data, která vyvolávají otázky a indikují, že publikovaná chinon methidová teorie toxicity by nemusela být jediným mechanismem vyskytujícím se u takrinu a jeho derivátů.

Souhrnné výsledky předkládané disertační práce přináší nové informace v oblasti vývoje nových takrinových derivátů, které mohou přispět k racionalizaci vývoje takrinových derivátů jakožto léčiv v terapii Alzheimerovy demence se sníženou, případně nevyskytující se hepatotoxicitou.

6 SEZNAM PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

- 1) Gorecki L., Misiachna A., Damborsky J., Dolezal R., Korabecny J., Cejkova L., Hakenova K., Chvojkova M., Karasova Zdarova J., Prchal L., **Novak M.**, Kolcheva M., Kortus S., Vales M., Horak M., Soukup O. *Structure-activity relationships of dually-acting acetylcholinesterase inhibitors derived from tacrine on N-methyl-D-Aspartate receptors*. Eur J Med Chem (2021); 219; 113434.

IF₂₀₂₁ = 7,088; IF Quartile = **Q1**; AIS Quartile= **Q1**

Podíl autora: experimentální práce (LC-MS analýza, vývoj LC-MS metody, optimalizace úpravy vzorků, příprava a analýza vzorků plasmy a mozku v rámci testování přestupu přes HEB), zpracování dat, podíl na tvorbě textu publikace (metodika, interpretace výsledků).

- 2) Kaniakova M., Korabecny J., Holubova K., Kleteckova L., Chvojkova M., Hakenova K., Prchal L., **Novak M.**, Dolezal R., Hepnarova V., Svobodova B., Kucera T., Lichnerova K., Krausova B., Horak M., Vales K., Soukup O. *7-phenoxytacrine is a dually acting drug with neuroprotective efficacy in vivo*. Biochem Pharmacol (2021); 186; 114460.

IF₂₀₂₁ = 6,100; IF Quartile = **Q1**; AIS Quartile= **Q1**

Podíl autora: experimentální práce (LC-MS analýza, vývoj LC-MS metody, příprava a analýza vzorků plasmy a mozku v rámci farmakokinetických studií), zpracování dat, podíl na tvorbě textu publikace (metodika, interpretace výsledků).

- 3) **Novak M.**, Svobodova B., Konecny J., Kuratkova A., Nevosadova L., Prchal L., Korabecny J., Lauschke V. M., Soukup O., Kucera R. *UHPLC-Orbitrap study of the first phase tacrine in vitro metabolites and related Alzheimer's drug candidates using human liver microsomes*. J Pharm Biomed Anal (2023); 224; 115154.

IF₂₀₂₂ = 3,400; IF Quartile = **Q2**; AIS Quartile= **Q2**

Podíl autora: experimentální práce (provedení a optimalizace podmínek mikrosomálních experimentů, vývoj a optimalizace LC-MS metody, interpretace fragmentačních spekter, návrh struktur metabolitů), zpracování a interpretace dat, hlavní podíl na tvorbě textu publikace a zpracování revizí spoluautorů.

- 4) **Novak M.**, Vajrychova M., Koutsilieri S., Sismanoglou D., Koblrova T., Prchal L., Svobodova B., Korabecny J., Zarybnicky T., Raisova-Stuchlikova L., Skalova L., Lauschke V. M., Kucera R., Soukup O. *Tacrine first phase biotransformation and associated hepatotoxicity; a possible way to avoid quinone methide formation*. ACS Chem. Biol (2023); in press

IF₂₀₂₂ = 4,0; IF Quartile = **Q2**; AIS Quartile= **Q1**

Podíl autora: experimentální práce (mikrosomální experimenty, HPLC-MS měření), zpracování a interpretace dat, hlavní podíl na tvorbě a finalizaci textu publikace, zpracování revizí spoluautorů, reakce na připomínky editora a oponentů.

7 DALŠÍ AUTORSKÉ PUBLIKACE NEZAHRNUTÉ DO DISERTAČNÍ PRÁCE

- 1) Finger V., Kucera T., Kafkova R., Muckova L., Dolezal R., Kubes J., **Novak M.**, Prchal L., Lakatos L. Andrs M., Hympanova M., Kufa M., Spiwok V., Soukup O., Mezeiova E., Janousek J. Nevsadova L., Benkova M., Kitson R., Kratky, M., Bösze S., Mikušová k., Hartkoorn R., Roh J., Korabecny J. *2,6-Disubstituted 7-(Naphthalen-2-Ylmethyl)-7h-Purines as a New Class of Potent Antitubercular Agents Inhibiting Dpre1*. Eur J Med Chem (2023); 258, 115611.
(IF₂₀₂₂ = 7.088; Q1)
- 2) Nawroth D., Bouz G., Jandourek O., Konecna K., Paterova P., Barta P., **Novak M.**, Kučera R., Zemanova J., Forbak M., Kordulakova J., Pavlis O., Kubickova P., Dolezal M., Zitko M. *Antimycobacterial pyridine carboxamides: from design to in vivo activity*. Eur J Med Chem (2023); 258; 115617.
(IF₂₀₂₂ = 7.088; Q1)
- 3) Bouz G., Slechta P., Jandourek O., Konecna K., Paterova P., Barta P., **Novak M.**, Kucera R., Dal N. J. K., Fenaroli F., Zemanova J., Forbak M., Kordulakova J., Pavlis O., Kubickova P., Dolezal M., Zitko J. *Hybridization Approach Toward Novel Antituberculars: Design, Syntheiss, and Biological Evaluation of Compounds Combining Pyrazinamide and 4-Aminosalicylis Acid*. ACS Infect Dis (2023); 9; 79-96.
(IF₂₀₂₂ = 5,300; Q1)
- 4) Bures J., Tacheci I., Kvetina J., Radochova V., Prchal L., Kohoutova D., Valis M., **Novak M.**, Dolezal R., Kopacova M., Rejchrt S., Sestak V., Knoblochova V., Peterova E., Zdarova Karasova J., *The Impact of Dextran Sodium Sulfate-Induced Gastrointestinal Injury on the Pharmacokinetic Parameters of Donepezil and Its Active Metabolite 6-O-Desmethyldonepezil and Gastric Myoelectric Activity in Experimental Pigs*. Molecules (2021); 26; 2160.
(IF₂₀₂₁ = 4,927; Q2)
- 5) Montesdeoca-Esponda S., Torres-Pardon M. E., Novak M., Krchova L., Sosa Ferrera Z., Rodriguer Santana J. J. Occurrence of Benzotriazole UV Stabilizers in Coastal Fishes. *J Environ Manage* (2020); 269; 110805.
(IF₂₀₂₀ = 6,789; Q1)
- 6) Godyn, J., Gucwa D., Koblrova T., **Novak M.**, Soukup O., Malawska B., Bajda M. *Novel Application of Capillary Electrophoresis with a Liposome Coated Capillary for Prediction of Blood-Brain Barrier Permeability*. Talanta (2020); 217; 121023.
(IF₂₀₂₀ = 6.057; Q1)
- 7) Benkova, M., Soukup O., Prchal L., Sleha R., Elersek T., **Novak M.**, Sepcic K., Gunde Cimerman N., Dolezal R., Bostik V., Bostik P., Marek J., *Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-activity Dependence of Three Series of Dichained N-Alkylammonium Salts*. ChemistrySelect (2019); 4; 12076-12084.
(IF₂₀₁₉ = 1.811; Q3)
- 8) Dolezal R., Houdkova I., Kalasz H., Andrys R., **Novak M.**, Maltsevskaya V. N., Karaskova N., Kolar K., Novotna E., Kuca K., Zdarova Karasova J. *Determination of Hypericin in Hypericum perforatum (St. John's Wort) Using Classical C18 and Pentafluorophenyl Stationary Phases: Contribution of Pi-Pi Interactions to High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Analytical Letters. (2019); 52; 1788-1812.
(IF₂₀₁₉ = 1.467; Q4)
- 9) Dolezal R., Karaskova N., Musil K., **Novak M.**, Maltsevskaya V. N., Malinak D., Kolar K., Soukup O., Kuca K., Zdarova Karasova J. *Characterization of the Penetration of the Blood-Brain Barrier by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Using a Stationary Phase with an Immobilized Artificial Membrane*. Analytical Letters. (2018); 51; 2401-2414.
(IF₂₀₁₈ = 1.248; Q4)

8 PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONFERENCÍCH

Přednášky

Martin Novák, Ondřej Soukup: *Biotransformation of tacrine implying its hepatotoxicity and how to avoid it*, XXVII Konference Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, 8. 2. 2023

Martin Novák, Ondřej Soukup, Radim Kučera: *LC-MS/MS study of new promising tacrine derivatives biotransformation*, 13. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, 1-2. 2. 2023

Martin Novák: *Biotransformation of tacrine implying its hepatotoxicity and how to avoid it*, Annual conference IT4Neuro(degeneration), Jablonné nad Orlicí, 6-7. 10. 2022

Ondřej Soukup, **Martin Novák**: *Targeting tacrine hepatotoxicity associated with the CYP biotransformation*, Interdisciplinary Toxicology Conference – TOXCON 2022, Hradec Králové, 29. 8. - 1. 9. 2022.

Martin Novák, Radim Kučera: *LC-MS/MS study of first phase in-vitro biotransformation of new promising tacrine derivatives*, 12. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, 1-2. 2. 2022 – cena za nejlepší přednášku v rámci sekce Pharmaceutical analysis and analytical chemistry

Martin Novák, Radim Kučera, Rafael Doležal: *LC-MS/MS study of first phase in-vitro biotransformation of new promising tacrine derivatives*, 11. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, 27-28. 1. 2021

Martin Novák, Radim Kučera, Rafael Doležal, Lukáš Prchal: *LC-MS/MS study of the first phase in-vitro biotransformation of new promising tacrine derivatives*, 10. Postgraduální a Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, 22-23. 1. 2020

Martin Novák: *LC-MS/MS studie distribuce a I. fáze in vitro a in vivo biotransformace nových derivátů takrinu*, V. Postgraduální vědecká konference, Dolní Malá Úpa 17-18. 1. 2019

Plakátová sdělení - poster

Vladimír Finger, Martin Kufa, **Martin Novák**, Jak Kubeš, Jan Korabecny, Jaroslav Roh: *Synthesis of purine derivatives with antimycobacterial activity*, Interdisciplinary Toxicology Conference – TOXCON 2022, Hradec Králové, 29. 8. - 1. 9. 2022.

Martin Novák, Lukáš Prchal, Rafael Doležal, Radim Kučera: *LC-MS/MS study of first phase in-vitro biotransformation of new promising tacrine derivatives*, VII. International scientific conference Applied Natural Sciences - ANS 2019, Tále, Slovenská republika, 25-27. 9. 2019

9 ÚČAST V GRANTECH

Spolunavrhovatel

- Structure-activity-toxicity relationship in newly discovered agents with high antimycobacterial activity. (Start/MED/051)

Člen kolektivu

- Biotransformace takrinu implikující jeho hepatotoxicitu. (GA23-07570S)
- Nervově paralytické látky ze skupiny novičoků - toxicita a léčba. (GA22-12859S)
- Vývoj nových kandidátních léčiv pro terapii tuberkulózy. (NU21-05-00446)
- Nové neuroprotektivní látky na bázi antagonismu NMDA receptorů a cholinergní stimulace. (GA20-12047S)
- Duálně účinné potenciátory kognice pro paliativní léčbu Alzheimerovy choroby. (NU20-08-00296)
- Specifické serotonin-dopaminové modulátory a jejich potenciál v modelu indukované psychózy. (GA19-11332S)
- Vývoj polyvalentního dekontaminačního činidla. (NV18-09-00181)
- Vliv experimentálního gastrointestinálního poškození na farmakokinetiku léčiv Alzheimerovy choroby. (GA18-13283S)
- Reaktivátory butyrylcholinesterasy pro přípravu pseudo-katalytických scavengerů využitelných při intoxikacích organofosforovými sloučeninami. (GA18-01734S)
- Nové hybridní molekuly v léčbě kognitivních poruch spojených s neurodegenerací. (GA16-08554S)
- Koncept nekvarterních reaktivátorů AChE jakožto antidot otrav organofosfáty - nová naděje či slepá cesta? (GA15-16701S)

10 STÁŽE A DALŠÍ ODBORNÉ ZKUŠENOSTI

- Účast na 23. ročníku Školy hmotnostní spektrometrie, Milovy, 4-9. 9. 2022
- Absolvování kurzu Analýza dat v software Graphpad – prakticky, názorně, jednoduše, Milovy, 5. 9. 2022
- Zahraniční stáž na Institute of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical (Bio-) Analysis, University of Tübingen, Germany pod vedením Prof. Dr. Michaela Lämmerhofera. (1. 2. – 30. 4. 2022)
- Účast na 8. ročníku České chromatografické školy, Zaječí, 19-22. 9. 2021 – 1. místo v soutěžním znalostním workshopu
- Účast na 22. ročníku Školy hmotnostní spektrometrie, Srní, 5-10. 9. 2021
- Účast na 21. ročníku Školy hmotnostní spektrometrie, Srní, 13-18. 9. 2020
- Absolvování kurzu a získání Osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů podle 15d ods. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. (26-30. 11. 2018)

11 REFERENCE

- [1] A. Alzheimer, R. A. Stelzmann, H. N. Schnitzlein, F. R. Murtagh, 'An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde"', *Clin Anat* **1995**, *8*, 429–431.
- [2] P. Scheltens, K. Blennow, M. M. B. Breteler, B. de Strooper, G. B. Frisoni, S. Salloway, W. M. Van der Flier, 'Alzheimer's disease', *Lancet* **2016**, *388*, 505–517.
- [3] World Health Organization, 'World failing to address dementia challenge', [online] **2021** cit. [2023-08-23], dostupné z: <https://www.who.int/news/item/02-09-2021-world-failing-to-address-dementia-challenge>
- [4] Healthdata, 'The Lancet Public Health: Global dementia cases set to triple by 2050 unless countries address risk factors', [online] **2022** cit. [2023-08-20], dostupné z: <https://www.healthdata.org/news-events/newsroom/news-releases/lancet-public-health-global-dementia-cases-set-triple-2050>
- [5] 'AISLP, informační systém léčivých přípravků', [online] **2023** cit. [2023-08-22], dostupné z: <https://www.aislp.cz/>
- [6] J. Cummings, G. Lee, K. Zhong, J. Fonseca, K. Taghva, 'Alzheimer's disease drug development pipeline: 2021', *A&D Transl Res & Clin Interv* **2021**, *7*, DOI 10.1002/trc2.12179.
- [7] H. Hippus, G. Neundörfer, 'The discovery of Alzheimer's disease', *Dialogues Clin Neurosci* **2003**, *5*, 101–108.
- [8] H. D. Yang, D. H. Kim, S. B. Lee, L. D. Young, 'History of Alzheimer's Disease', *Dement Neurocogn Disord* **2016**, *15*, 115–121.
- [9] C. Turkington, J. Harris, *The Encyclopedia of the Brain and Brain Disorders*, Infobase Publishing, 2010.
- [10] J. Korabecny, O. Soukup, M. Valis, *Alzheimerova Nemoc*, Maxdorf s.r.o., **2020**.
- [11] L. Fan, C. Mao, X. Hu, S. Zhang, Z. Yang, Z. Hu, H. Sun, Y. Fan, Y. Dong, J. Yang, C. Shi, Y. Xu, 'New Insights Into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease', *Frontiers in Neurology* **2020**, *10*.
- [12] M. P. Murphy, H. LeVine, 'Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide', *J Alzheimers Dis* **2010**, *19*, 311–323.
- [13] J. Mačák, J. Mačáková, *Patologie*, Grada, **2022**.
- [14] J. Kim, J. M. Basak, D. M. Holtzman, 'The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease', *Neuron* **2009**, *63*, 287–303.
- [15] M. Goedert, 'Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease', *Trends Neurosci* **1993**, *16*, 460–465.
- [16] R. Fischer, O. Maier, 'Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF', *Oxid Med Cell Longev* **2015**, *2015*, 610813.
- [17] M. Kawahara, I. Ohtsuka, S. Yokoyama, M. Kato-Negishi, Y. Sadakane, 'Membrane Incorporation, Channel Formation, and Disruption of Calcium Homeostasis by Alzheimer's β -Amyloid Protein', *Int J Alzheimers Dis* **2011**, *2011*, 304583.
- [18] T. Babic, 'The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress', *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **1999**, *67*, 558.
- [19] R. T. Bartus, R. L. Dean, B. Beer, A. S. Lippa, 'The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction', *Science* **1982**, *217*, 408–414.

- [20] J. Hardy, D. J. Selkoe, 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics', *Science* **2002**, *297*, 353–356.
- [21] P. J. Crouch, S.-M. E. Harding, A. R. White, J. Camakaris, A. I. Bush, C. L. Masters, 'Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease', *Int J Biochem Cell Biol* **2008**, *40*, 181–198.
- [22] T. Jonsson, J. K. Atwal, S. Steinberg, J. Snaedal, P. V. Jonsson, S. Bjornsson, H. Stefansson, P. Sulem, D. Gudbjartsson, J. Maloney, K. Hoyte, A. Gustafson, Y. Liu, Y. Lu, T. Bhangale, R. R. Graham, J. Huttenlocher, G. Bjornsdottir, O. A. Andreassen, E. G. Jönsson, A. Palotie, T. W. Behrens, O. T. Magnusson, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, R. J. Watts, K. Stefansson, 'A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline', *Nature* **2012**, *488*, 96–99.
- [23] R. L. Albin, J. T. Greenamyre, 'Alternative excitotoxic hypotheses', *Neurology* **1992**, *42*, 733–733.
- [24] D. A. Butterfield, C. B. Pocernich, 'The Glutamatergic System and Alzheimer's Disease: Therapeutic Implications', *CNS Drugs* **2003**, *17*, 641–652.
- [25] A. Mullard, 'Controversial Alzheimer's drug approval could affect other diseases', *Nature* **2021**, *595*, 162–163.
- [26] G. Lalli, J. M. Schott, J. Hardy, B. De Strooper, 'Aducanumab: a new phase in therapeutic development for Alzheimer's disease?', *EMBO Mol Med* **2021**, *13*, e14781.
- [27] C. H. Van Dyck, C. J. Swanson, P. Aisen, R. J. Bateman, C. Chen, M. Gee, M. Kanekiyo, D. Li, L. Reyderman, S. Cohen, L. Froelich, S. Katayama, M. Sabbagh, B. Vellas, D. Watson, S. Dhadda, M. Irizarry, L. D. Kramer, T. Iwatsubo, 'Lecanemab in Early Alzheimer's Disease', *N Engl J Med* **2023**, *388*, 9–21.
- [28] B. Ibach, E. Haen, 'Acetylcholinesterase inhibition in Alzheimer's Disease', *Curr Pharm Des* **2004**, *10*, 231–251.
- [29] H. Dvir, I. Silman, M. Harel, T. L. Rosenberry, J. L. Sussman, 'Acetylcholinesterase: from 3D structure to function', *Chem Biol Interact* **2010**, *187*, 10–22.
- [30] V. N. Talesa, 'Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease', *Mech Ageing Dev* **2001**, *122*, 1961–1969.
- [31] J. Patocka, D. Jun, K. Kuca, 'Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease', *Curr Drug Metab* **2008**, *9*, 332–335.
- [32] Databáze léčiv SÚKL, 'Donepezil 5-10mg SPC', [online] **2011** cit. [2023-08-15], dostupné z: https://prehledy.sukl.cz/prehled_liciv.html#/
- [33] M. Racchi, M. Mazzucchelli, E. Porrello, C. Lanni, S. Govoni, 'Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules', *Pharmacol Res* **2004**, *50*, 441–451.
- [34] M. W. Jann, K. L. Shirley, G. W. Small, 'Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors', *Clin Pharmacokinet* **2002**, *41*, 719–739.
- [35] N. Tsuno, 'Donepezil in the treatment of patients with Alzheimer's disease', *Expert Rev Neurother* **2009**, *9*, 591–598.
- [36] 'Databáze léčiv SÚKL', [online] **2023** cit. [2023-08-19], dostupné z: https://prehledy.sukl.cz/prehled_liciv.html#/
- [37] T. Müller, 'Rivastigmine in the treatment of patients with Alzheimer's disease', *Neuropsychiatric Disease and Treatment* **2007**, *3*, 211.
- [38] G. Lefèvre, G. Sędek, S. S. Jhee, M. T. Leibowitz, H.-L. Huang, A. Enz, S. Maton, L. Ereshefsky, F. Pommier, H. Schmidli, S. Appel-Dingemanse, 'Pharmacokinetics and

- Pharmacodynamics of the Novel Daily Rivastigmine Transdermal Patch Compared With Twice-daily Capsules in Alzheimer's Disease Patients', *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **2008**, *83*, 106–114.
- [39] L. J. Scott, K. L. Goa, 'Galantamine', *Drugs* **2000**, *60*, 1095–1122.
- [40] B. Seltzer, 'Galantamine-ER for the treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease', *Clin Interv Aging* **2010**, *5*, 1–6.
- [41] T. Heinen-Kammerer, H. Rulhoff, S. Nelles, R. Rychlik, 'Added therapeutic value of memantine in the treatment of moderate to severe Alzheimer's disease', *Clin Drug Investig* **2006**, *26*, 303–314.
- [42] B. Winblad, R. W. Jones, Y. Wirth, A. Stöffler, H. J. Möbius, 'Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomised clinical trials', *Dement Geriatr Cogn Disord* **2007**, *24*, 20–27.
- [43] G. Evin, G. Lessene, S. Wilkins, 'BACE Inhibitors as Potential Drugs for the Treatment of Alzheimers Disease: Focus on Bioactivity', *RPCN* **2011**, *6*, 91–106.
- [44] J. R. Sims, K. J. Selzler, A. M. Downing, B. A. Willis, C. D. Aluise, J. Zimmer, S. Bragg, S. Andersen, M. Ayan-Oshodi, E. Liffick, J. Eads, A. M. Wessels, S. Monk, J. Schumi, J. Mullen, 'Development Review of the BACE1 Inhibitor Lanabecestat (AZD3293/LY3314814)', *J Prev Alzheimers Dis* **2017**, *4*, 247–254.
- [45] T. Blume, S. Filser, A. Jaworska, J.-F. Blain, G. Koenig, K. Moschke, S. F. Lichtenthaler, J. Herms, 'BACE1 Inhibitor MK-8931 Alters Formation but Not Stability of Dendritic Spines', *Frontiers in Aging Neuroscience* **2018**, *10*.
- [46] P. C. May, B. A. Willis, S. L. Lowe, R. A. Dean, S. A. Monk, P. J. Cocke, J. E. Audia, L. N. Boggs, A. R. Borders, R. A. Brier, D. O. Calligaro, T. A. Day, L. Ereshefsky, J. A. Erickson, H. Gevorkyan, C. R. Gonzales, D. E. James, S. S. Jhee, S. F. Komjathy, L. Li, T. D. Lindstrom, B. M. Mathes, F. Martényi, S. M. Sheehan, S. L. Stout, D. E. Timm, G. M. Vaught, B. M. Watson, L. L. Winneroski, Z. Yang, D. J. Mergott, 'The potent BACE1 inhibitor LY2886721 elicits robust central A β pharmacodynamic responses in mice, dogs, and humans', *J Neurosci* **2015**, *35*, 1199–1210.
- [47] H. Cai, Y. Wang, D. McCarthy, H. Wen, D. R. Borchelt, D. L. Price, P. C. Wong, 'BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons', *Nat Neurosci* **2001**, *4*, 233–234.
- [48] K. W. Gillman, J. E. Jr. Starrett, M. F. Parker, K. Xie, J. J. Bronson, L. R. Marcin, K. E. McElhone, C. P. Bergstrom, R. A. Mate, R. Williams, J. E. Jr. Meredith, C. R. Burton, D. M. Barten, J. H. Toyn, S. B. Roberts, K. A. Lentz, J. G. Houston, R. Zaczek, C. F. Albright, C. P. Decicco, J. E. Macor, R. E. Olson, 'Discovery and Evaluation of BMS-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable γ -Secretase Inhibitor', *ACS Med. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 120–124.
- [49] T. A. Lanz, K. M. Wood, K. E. G. Richter, C. E. Nolan, S. L. Becker, N. Pozdnyakov, B.-A. Martin, P. Du, C. E. Oborski, D. E. Wood, T. M. Brown, J. E. Finley, S. A. Sokolowski, C. D. Hicks, K. J. Coffman, K. F. Geoghegan, M. A. Brodney, D. Liston, B. Tate, 'Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the gamma-secretase inhibitor PF-3084014', *J Pharmacol Exp Ther* **2010**, *334*, 269–277.
- [50] R. L. Martone, H. Zhou, K. Atchison, T. Comery, J. Z. Xu, X. Huang, X. Gong, M. Jin, A. Kreft, B. Harrison, S. C. Mayer, S. Aschmies, C. Gonzales, M. M. Zaleska, D. R. Riddell, E. Wagner, P. Lu, S.-C. Sun, J. Sonnenberg-Reines, A. Oganessian, K. Adkins, M. W. Leach, D. W. Clarke,

- D. Huryn, M. Abou-Gharbia, R. Magolda, J. Bard, G. Frick, S. Raje, S. B. Forlow, C. Balliet, M. E. Burczynski, P. H. Reinhart, H. I. Wan, M. N. Pangalos, J. S. Jacobsen, 'Begacestat (GSI-953): a novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein gamma-secretase for the treatment of Alzheimer's disease', *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, *331*, 598–608.
- [51] B. P. Imbimbo, G. A. M. Giardina, 'γ-secretase inhibitors and modulators for the treatment of Alzheimer's disease: disappointments and hopes', *Curr Top Med Chem* **2011**, *11*, 1555–1570.
- [52] H.-C. Liu, S.-J. Leu, D.-M. Chuang, 'Roles of Glycogen Synthase Kinase-3 in Alzheimer's Disease: From Pathology to Treatment Target', *Journal of Experimental & Clinical Medicine* **2012**, *4*, 135–139.
- [53] L. Martin, X. Latypova, C. M. Wilson, A. Magnaudeix, M.-L. Perrin, C. Yardin, F. Terro, 'Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease', *Ageing Research Reviews* **2013**, *12*, 289–309.
- [54] A. M. Pooler, W. Noble, D. P. Hanger, 'A role for tau at the synapse in Alzheimer's disease pathogenesis', *Neuropharmacology* **2014**, *76 Pt A*, 1–8.
- [55] A. J. Wagstaff, D. McTavish, 'Tacrine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease', *Drugs Aging* **1994**, *4*, 510–540.
- [56] M. Horak, K. Holubova, E. Nepovimova, J. Krusek, M. Kaniakova, J. Korabecny, L. Vyklicky, K. Kuca, A. Stuchlik, J. Ricny, K. Vales, O. Soukup, 'The pharmacology of tacrine at N -methyl- d -aspartate receptors', *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **2017**, *75*, 54–62.
- [57] W. G. Blackard, G. K. Sood, D. R. Crowe, M. B. Fallon, 'Tacrine. A cause of fatal hepatotoxicity?', *J Clin Gastroenterol* **1998**, *26*, 57–59.
- [58] S. Madden, V. Spaldin, R. N. Hayes, T. F. Woolf, W. F. Pool, B. K. Park, 'Species variation in the bioactivation of tacrine by hepatic microsomes', *Xenobiotica* **1995**, *25*, 103–116.
- [59] R. Balson, P. R. Gibson, D. Ames, P. S. Bhathal, 'Tacrine-Induced Hepatotoxicity: Tolerability and Management', *CNS Drugs* **1995**, *4*, 168–181.
- [60] B. K. Park, S. Madden, V. Spaldin, 'Tacrine transaminitis: potential mechanism.', *Alz Dis Assoc Disord* **1994**, 39–49.
- [61] V. Spaldin, S. Madden, W. Pool, T. Woolf, B. Park, 'The effect of enzyme inhibition on the metabolism and activation of tacrine by human liver microsomes.', *British Journal of Clinical Pharmacology* **1994**, *38*, 15–22.
- [62] T. F. Woolf, W. F. Pool, S. M. Bjorge, T. Chang, O. P. Goel, C. F. Purchase, M. C. Schroeder, K. L. Kunze, W. F. Trager, 'Bioactivation and irreversible binding of the cognition activator tacrine using human and rat liver microsomal preparations. Species difference', *Drug Metab Dispos* **1993**, *21*, 874–882.
- [63] S. Qian, S. K. Wo, Z. Zuo, 'Pharmacokinetics and brain dispositions of tacrine and its major bioactive monohydroxylated metabolites in rats', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, *61*, 57–63.
- [64] A. McEneny-King, W. Osman, A. N. Edginton, P. P. N. Rao, 'Cytochrome P450 binding studies of novel tacrine derivatives: Predicting the risk of hepatotoxicity', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2017**, *27*, 2443–2449.

- [65] R. Zubarev, A. Makarov, 'Orbitrap mass spectrometry', *Analytical chemistry* **2013**, *85*, DOI 10.1021/ac4001223.
- [66] L. Ismaili, B. Refouvet, M. Benchekroun, S. Brogi, M. Brindisi, S. Gemma, G. Campiani, S. Filipic, D. Agbaba, G. Esteban, M. Unzeta, K. Nikolic, S. Butini, J. Marco-Contelles, 'Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease', *Prog Neurobiol* **2017**, *151*, 4–34.
- [67] B. K. Sharma, S. Verma, Y. S. Prabhakar, 'Topological and physicochemical characteristics of 1,2,3,4-Tetrahydroacridin- 9(10H)-ones and their antimalarial profiles: a composite insight to the structure-activity relation', *Curr Comput Aided Drug Des* **2013**, *9*, 317–335.
- [68] S. Silva, C. Alves, D. Duarte, A. Costa, B. Sarmiento, A. J. Almeida, P. Gomes, N. Vale, 'Model Amphipathic Peptide Coupled with Tacrine to Improve Its Antiproliferative Activity', *Int J Mol Sci* **2020**, *22*, 242.
- [69] A. Bublely, A. Erofeev, P. Gorelkin, E. Beloglazkina, A. Majouga, O. Krasnovskaya, 'Tacrine-Based Hybrids: Past, Present, and Future', *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 1717.
- [70] E. Nepovimova, J. Korabecny, R. Dolezal, K. Babkova, A. Ondrejcek, D. Jun, V. Sepsova, A. Horova, M. Hrabnova, O. Soukup, N. Bukum, P. Jost, L. Muckova, J. Kassa, D. Malinak, M. Andrs, K. Kuca, '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.
- [71] K. Chalupova, J. Korabecny, M. Bartolini, B. Monti, R. Caliandro, A. Pesaresi, X. Brazzolotto, A. Gastellier, F. Nachon, J. Pejchal, M. Jarosova, V. Hepnarova, D. Jun, M. Hrabnova, R. Doležal, J. Zdarova Karasova, M. Mžik, Z. Kristofikova, J. Misik, L. Muckova, P. Jost, O. Soukup, M. Benkova, M. Setnicka, L. Habartova, M. Chvojkova, L. Kleteckova, K. Vales, E. Mezeiova, E. Uliassi, M. Valis, E. Nepovimova, M. Bolognesi, K. Kuca, 'Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease', *European journal of medicinal chemistry* **2019**, *168*, DOI 10.1016/j.ejmech.2019.02.021.
- [72] D. Alonso, I. Dorrnsoro, L. Rubio, P. Muñoz, García-Palomero, 'Donepezil-tacrine hybrid related derivatives as new dual binding site inhibitors of AChE', *Bioorganic & medicinal chemistry* **2005**, *13*, DOI 10.1016/j.bmc.2005.09.029.
- [73] G. A. Patani, Y. P. Pang, Y. W. Chien, 'A potent and selective tacrine analog--biomembrane permeation and physicochemical characterization', *Pharm Dev Technol* **2005**, *10*, 525–538.
- [74] O. Benek, J. Korabecny, O. Soukup, 'A Perspective on Multi-target Drugs for Alzheimer's Disease', *Trends Pharmacol Sci* **2020**, *41*, 434–445.
- [75] J. Misik, E. Nepovimova, J. Pejchal, J. Kassa, J. Korabecny, O. Soukup, 'Cholinesterase Inhibitor 6-Chlorotacrine - In Vivo Toxicological Profile and Behavioural Effects', *CAR* **2018**, *15*, 552–560.
- [76] M. Recanatini, A. Cavalli, F. Belluti, L. Piazzzi, A. Rampa, A. Bisi, S. Gobbi, P. Valenti, V. Andrisano, M. Bartolini, V. Cavrini, 'SAR of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine-based acetylcholinesterase inhibitors: synthesis, enzyme inhibitory activity, QSAR, and structure-based CoMFA of tacrine analogues', *J Med Chem* **2000**, *43*, 2007–2018.
- [77] J. Dejmek, '7-MEOTA', *Drug Future* **1990**, *1990*, 126–129.

- [78] O. Soukup, D. Jun, J. Zdarova-Karasova, J. Patocka, K. Musilek, J. Korabecny, J. Krusek, M. Kaniakova, V. Sepsova, J. Mandikova, F. Trejtnar, M. Pohanka, L. Drtinova, M. Pavlik, G. Tobin, K. Kuca, 'A Resurrection of 7-MEOTA: A Comparison with Tacrine', *CAR* **2013**, *10*, 893–906.
- [79] M. Kaniakova, L. Kleteckova, K. Lichnerova, K. Holubova, K. Skrenkova, M. Korinek, J. Krusek, T. Smejkalova, J. Korabecny, K. Vales, O. Soukup, M. Horak, '7-Methoxyderivative of tacrine is a "foot-in-the-door" open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo', *Neuropharmacology* **2018**, *140*, 217–232.
- [80] R.J.S., 'Ověření účinnosti MTX při psychiatrických onemocněních.', *Psychiatricke centrum Praha* **1990**.
- [81] V. Filip, '9-amino-7-methoxy-1234-tetrahydroakridin: I. faze klinického zkouseni', *Výzkumný ústav psychiatrický* **1988**.
- [82] L. Gorecki, A. Misiachna, J. Damborsky, R. Dolezal, J. Korabecny, L. Cejkova, K. Hakenova, M. Chvojkova, J. Z. Karasova, L. Prchal, M. Novak, M. Kolcheva, S. Kortus, K. Vales, M. Horak, O. Soukup, 'Structure-activity relationships of dually-acting acetylcholinesterase inhibitors derived from tacrine on N-methyl-d-Aspartate receptors', *Eur J Med Chem* **2021**, *219*, 113434.
- [83] M. Kaniakova, J. Korabecny, K. Holubova, L. Kleteckova, M. Chvojkova, K. Hakenova, L. Prchal, M. Novak, R. Dolezal, V. Hepnarova, B. Svobodova, T. Kucera, K. Lichnerova, B. Krausova, M. Horak, K. Vales, O. Soukup, '7-phenoxytacrine is a dually acting drug with neuroprotective efficacy in vivo', *Biochem Pharmacol* **2021**, *186*, 114460.
- [84] D. Zhang, S. Surapaneni, *ADME-Enabling Technologies In Drug Design And Development*, Wiley, **2012**.
- [85] I. Kola, J. Landis, 'Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates?', *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 711–715.
- [86] Burrill & Company, 'Analysis for Pharmaceutical Research and Manufacturers of America; and Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, PhRMA Annual Member Survey, Washington, DC: PhRMA' **2010**.
- [87] D. Sun, W. Gao, H. Hu, S. Zhou, 'Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it?', *Acta Pharm Sin B* **2022**, *12*, 3049–3062.
- [88] M. S. Alavijeh, A. M. Palmer, 'The pivotal role of drug metabolism and pharmacokinetics in the discovery and development of new medicines', *IDrugs* **2004**, *7*, 755–763.
- [89] A. M. Davis, R. J. Riley, 'Predictive ADMET studies, the challenges and the opportunities', *Curr Opin Chem Biol* **2004**, *8*, 378–386.
- [90] W. Rubas, M. E. Cromwell, Z. Shahrokh, J. Villagran, T. N. Nguyen, M. Wellton, T. H. Nguyen, R. J. Mersny, 'Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue', *J Pharm Sci* **1996**, *85*, 165–169.
- [91] P. Artursson, 'Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa', *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1991**, *8*, 305–330.
- [92] P. Artursson, J. Karlsson, 'Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells', *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, *175*, 880–885.

- [93] S. Alqahtani, L. A. Mohamed, A. Kaddoumi, 'Experimental models for predicting drug absorption and metabolism', *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2013**, *9*, 1241–1254.
- [94] S. Schmidt, D. Gonzalez, H. Derendorf, 'Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics', *J Pharm Sci* **2010**, *99*, 1107–1122.
- [95] E. G. Solon, L. Kraus, 'Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry. Survey results on study design, methods, and regulatory compliance', *J Pharmacol Toxicol Methods* **2001**, *46*, 73–81.
- [96] EMEA Guidance, 'Guideline on risk assessment of medicinal products on human reproduction and lactation' **2006**.
- [97] G. W. Bemis, M. A., 'Designing libraries with CNS activity', *J Med Chem* **1999**, *42*, 4942–4951.
- [98] A. Reichel, 'The role of blood-brain barrier studies in the pharmaceutical industry', *Curr Drug Metab* **2006**, *7*, 183–203.
- [99] K. M. Mahar Doan, J. E. Humphreys, L. O. Webster, S. A. Wring, L. J. Shampine, C. J. Serabjit-Singh, K. K. Adkison, J. W. Polli, 'Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs', *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, *303*, 1029–1037.
- [100] A. Doran, R. Obach, Smith BJ, 'The impact of P -glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: Evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model.', *Drug Deliv Rev*, *33*, **2005**, 165-174 .
- [101] J. Caldwell, I. Gardner, N. Swales, 'An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion', *Toxicol Pathol* **1995**, *23*, 102–114.
- [102] D. B. Campbell, 'Are we doing too many animal biodisposition investigations before phase I studies in man? A re-evaluation of the timing and extent of ADME studies', *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **1994**, *19*, 283–293.
- [103] J. H. Lin, 'CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications', *Pharm Res* **2006**, *23*, 1089–1116.
- [104] V. Chu, H. J. Einolf, R. Evers, G. Kumar, D. Moore, S. Ripp, J. Silva, V. Sinha, M. Sinz, A. Skerjanec, 'In vitro and in vivo induction of cytochrome p450: a survey of the current practices and recommendations: a pharmaceutical research and manufacturers of america perspective', *Drug Metab Dispos* **2009**, *37*, 1339–1354.
- [105] L. Jia, X. Liu, 'The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practice (II): In Vitro Experiments', *Curr Drug Metab* **2007**, *8*, 822–829.
- [106] Cyprotex, 'Microsomal stability assay.', [online] **2023** cit. [2023-08-10], dostupné z: <https://www.cyprotex.com/admepk/in-vitro-metabolism/microsomal-stability>
- [107] D. Voet, J. Voet, *Biochemistry, Fourth Edition*, **2021**.
- [108] T. Geib, C. Lento, D. J. Wilson, L. Sleno, 'Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Acetaminophen Covalent Binding to Glutathione S-Transferases', *Front Chem* **2019**, *7*, 558.
- [109] C. C. Bell, V. M. Lauschke, S. U. Vorrink, H. Palmgren, R. Duffin, T. B. Andersson, M. Ingelman-Sundberg, 'Transcriptional, Functional, and Mechanistic Comparisons of Stem Cell-Derived Hepatocytes, HepaRG Cells, and Three-Dimensional Human Hepatocyte Spheroids as Predictive In Vitro Systems for Drug-Induced Liver Injury', *Drug Metab Dispos* **2017**, *45*, 419–429.

- [110] S. U. Vorrink, Y. Zhou, M. Ingelman-Sundberg, V. M. Lauschke, 'Prediction of Drug-Induced Hepatotoxicity Using Long-Term Stable Primary Hepatic 3D Spheroid Cultures in Chemically Defined Conditions', *Toxicol Sci* **2018**, *163*, 655–665.
- [111] R. Ramanathan, *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, John Wiley and Sons, **2009**.
- [112] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi I.*, Česká chromatografická škola, **2021**.
- [113] K. Sakodynskii, 'The life and scientific works of Michael Tswett', *Journal of Chromatography A* **1972**, *73*, 303–360.
- [114] F. Švec, 'Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií.', *Chemické listy* **2009**, 266–270.
- [115] L. Snyder, J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition*, John Wiley & Sons, **2010**.
- [116] J. Köhler, J. J. Kirkland, 'Improved silica-based column packings for high-performance liquid chromatography', *Journal of Chromatography A* **1987**, *385*, 125–150.
- [117] J. J. Kirkland, F. A. Truszkowski, C. H. Dilks, G. S. Engel, 'Superficially porous silica microspheres for fast high-performance liquid chromatography of macromolecules', *Journal of Chromatography A* **2000**, *890*, 3–13.
- [118] J. J. Kirkland, J. L. Glajch, R. D. Farlee, 'Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings', DOI 10.1021/ac00176a003can be found under <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac00176a003>, **2002**.
- [119] J. J. Kirkland, J. L. Glajch, R. D. Farlee, 'Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings', *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 2–11.
- [120] J. J. Kirkland, J. W. Henderson, 'Reversed-Phase HPLC Selectivity and Retention Characteristics of Conformationally Different Bonded Alkyl Stationary Phases', *J Chromatogr Sci* **1994**, *32*, 473–480.
- [121] N. S. Wilson, J. Gilroy, J. W. Dolan, L. R. Snyder, 'Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography. VI. Columns with embedded or end-capping polar groups', *J Chromatogr A* **2004**, *1026*, 91–100.
- [122] R. Brindle, K. Albert, 'Stationary phases with chemically bonded fluorene ligands: A new approach for environmental analysis of π -electron containing solutes', *Journal of Chromatography A* **1997**, *757*, 3–20.
- [123] G. E. Berendsen, K. A. Pikaart, Leo. De Galan, Cees. Olieman, '(Heptadecafluorodecyl)dimethylsilyl bonded phase for reversed-phase liquid chromatography', *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1990–1993.
- [124] D. S. Bell, A. D. Jones, 'Solute attributes and molecular interactions contributing to "U-shape" retention on a fluorinated high-performance liquid chromatography stationary phase', *Journal of Chromatography A* **2005**, *1073*, 99–109.
- [125] Y. Foo Wong, A. Makahleh, B. Saad, M. N. M. Ibrahim, A. Abdul Rahim, N. Brosse, 'UPLC method for the determination of vitamin E homologues and derivatives in vegetable oils, margarines and supplement capsules using pentafluorophenyl column', *Talanta* **2014**, *130*, 299–306.
- [126] J. Gross, *Mass Spectrometry, A Textbook, Third Edition*, Springer, **2017**.

- [127] S. Banerjee, 'Empowering Clinical Diagnostics with Mass Spectrometry', *ACS Omega* **2020**, *5*, 2041–2048.
- [128] M. Holčapek, C. Byrdwell, *Handbook of Advanced Chromatography/Mass Spectrometry Techniques*, Academic Press, **2017**.
- [129] S. H. Hansen, S. Pedersen-Bjergaard, *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, **2015**.
- [130] K. A. Hanold, J. Horner, R. Thakur, C. A. Miller, in *Proceedings of the 50th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **2002**, pp. 3–7.
- [131] R. T. Gallagher, M. P. Balogh, P. Davey, M. R. Jackson, I. Sinclair, L. J. Southern, 'Combined Electrospray Ionization–Atmospheric Pressure Chemical Ionization Source for Use in High-Throughput LC–MS Applications', *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 973–977.
- [132] L. C. Short, K. A. Hanold, S.-S. Cai, J. A. Syage, 'Electrospray ionization/atmospheric pressure photoionization multimode source for low-flow liquid chromatography/mass spectrometric analysis', *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 1561–1566.
- [133] M. M. Siegel, K. Tabei, F. Lambert, L. Candela, B. Zoltan, 'Evaluation of a dual electrospray ionization/atmospheric pressure chemical ionization source at low flow rates (~50 $\mu\text{L}/\text{min}$) for the analysis of both highly and weakly polar compounds', *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 1196–1203.
- [134] J. A. Syage, 'Mechanism of $[M + H]^+$ formation in photoionization mass spectrometry', *J Am Soc Mass Spectrom* **2004**, *15*, 1521–1533.
- [135] S. L. Koontz, M. B. Denton, 'A very high yield electron impact ion source for analytical mass spectrometry', *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1981**, *37*, 227–239.
- [136] W. Foci, 'The design of a mass spectrometer ion source based on computed ion trajectories', *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* **1969**, *3*, 285–291.
- [137] O. A. Schaeffer, 'An Improved Mass Spectrometer Ion Source', *Review of Scientific Instruments* **2004**, *25*, 660–662.
- [138] S. Gao, Z.-P. Zhang, H. T. Karnes, 'Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives', *Journal of Chromatography B* **2005**, *825*, 98–110.
- [139] J. V. Olsen, L. M. F. de Godoy, G. Li, B. Macek, P. Mortensen, R. Pesch, A. Makarov, O. Lange, S. Horning, M. Mann, 'Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap', *Mol Cell Proteomics* **2005**, *4*, 2010–2021.
- [140] ThermoFisher, 'Orbitrap Astral Mass Spectrometry' [online] **2023** cit. [2023-05-20], dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz>
- [141] Z. Wu, C. L. Hendrickson, R. P. Rodgers, A. G. Marshall, 'Composition of Explosives by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry', *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1879–1883.
- [142] M. W. Senko, C. L. Hendrickson, M. R. Emmett, S. D. H. Shi, A. G. Marshall, 'External accumulation of ions for enhanced electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry', *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, *8*, 970–976.

- [143] A. Makarov, E. Denisov, A. Kholomeev, W. Balschun, O. Lange, K. Strupat, S. Horning, 'Performance Evaluation of a Hybrid Linear Ion Trap/Orbitrap Mass Spectrometer', *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2113–2120.
- [144] A. Makarov, 'Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis', *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1156–1162.
- [145] M. Scigelova, A. Makarov, 'Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics', *Proteomics* **2006**, *6 Suppl 2*, 16–21.
- [146] P. Oksman, 'A Fourier transform time-of-flight mass spectrometer. A SIMION calculation approach', *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1995**, *141*, 67–76.
- [147] ThermoFisher, 'Orbitrap Astral Mass Spectrometer', [online] **2023** cit. [2023-08-20], dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms/orbitrap-astral-mass-spectrometer.html>.
- [148] A. Kaufman, 'Selecting the best Q Exactive Orbitrap mass spectrometer scan mode for your application' **2022**.
- [149] B. O. Keller, J. Sui, A. B. Young, R. M. Whittal, 'Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry', *Analytica Chimica Acta* **2008**, *627*, 71–81.
- [150] L. Nováková, M. Douša, *Moderní HPLC Separace v Teorii a Praxi II.*, Česká chromatografická škola, **2021**.
- [151] N. Drouin, P. Kubáň, S. Rudaz, S. Pedersen-Bjergaard, J. Schappler, 'Electromembrane extraction: Overview of the last decade', *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *113*, 357–363.
- [152] L. V. Eie, S. Pedersen-Bjergaard, F. A. Hansen, 'Electromembrane extraction of polar substances – Status and perspectives', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2022**, *207*, 114407.
- [153] S. Armenta, S. Garrigues, F. A. Esteve-Turrillas, M. de la Guardia, 'Green extraction techniques in green analytical chemistry', *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *116*, 248–253.
- [154] A. Olasupo, F. B. M. Suah, 'Trends in hollow fibre liquid phase microextraction for the preconcentration of pharmaceutically active compounds in aqueous solution: A case for polymer inclusion membrane', *Journal of Hazardous Materials* **2022**, *431*, 128573.
- [155] R. E. Kannouma, M. A. Hammad, A. H. Kamal, F. R. Mansour, 'Miniaturization of Liquid-Liquid extraction; the barriers and the enablers', *Microchemical Journal* **2022**, *182*, 107863.
- [156] L. Schettino, A. García-Juan, L. Fernández-Lozano, J. L. Benedé, A. Chisvert, 'Trace determination of prohibited acrylamide in cosmetic products by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography A* **2023**, *1687*, 463651.
- [157] R. Bonfiglio, R. C. King, T. V. Olah, K. Merkle, 'The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds', *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 1175–1185.
- [158] J. Ma, J. Shi, H. Le, R. Cho, J. C. Huang, S. Miao, B. K. Wong, 'A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis', *Journal of Chromatography B* **2008**, *862*, 219–226.

- [159] C. Hanson, *Recent Advances in Liquid-Liquid Extraction*, Elsevier, 2013.
- [160] J. Patočka, J. Bielašský, '[Biotransformation of the anticholinesterase agent, 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroacridine]', *Cesk Farm* **1991**, *40*, 130–132.
- [161] M. G. Vargas, J. Havel, J. Patočka, 'Capillary zone electrophoretic determination of some drugs against Alzheimer's disease', *Journal of Chromatography A* **1998**, *802*, 121–128.
- [162] A. Viveiros, A. Finkenstedt, B. Schaefer, M. Mandorfer, B. Scheiner, K. Lehner, M. Tobiasch, T. Reiberger, H. Tilg, M. Edlinger, H. Zoller, 'Transferrin as a predictor of survival in cirrhosis', *Liver Transpl* **2018**, *24*, 343–351.

Přílohy

Příloha č. 1

Gorecki L., Misiachna A., Damborsky J., Dolezal R., Korabecny J., Cejkova L., Hakenova K., Chvojkova M., Karasova Zdarova J., Prchal L., **Novak M.**, Kolcheva M., Kortus S., Vales M., Horak M., Soukup O.

Structure-activity relationships of dually-acting acetylcholinesterase inhibitors derived from tacrine on N-methyl-D-Aspartate receptors.

European Journal of Medicinal Chemistry (2021); 219; 113434

IF₂₀₂₁ = 7,088; IF Quartile = Q1; AIS Quartile = Q1

Příloha č. 2

Kaniakova M., Korabecny J., Holubova K., Kleteckova L., Chvojkova M., Hakenova K., Prchal L., **Novak M.**, Dolezal R., Hepnarova V., Svobodova B., Kucera T., Lichnerova K., Krausova B., Horak M., Vales K., Soukup O.

7-phenoxytacrine is a dually acting drug with neuroprotective efficacy in vivo.

Biochemical Pharmacology (2021); 186; 114460

IF₂₀₂₁ = 6,100; IF Quartile = Q1; AIS Quartile = Q1

Příloha č. 3

Novak M., Svobodova B., Konecny J., Kuratkova A., Nevosadova L., Prchal L., Korabecny J., Lauschke V. M., Soukup O., Kucera R.

UHPLC-Orbitrap study of the first phase tacrine in vitro metabolites and related Alzheimer's drug candidates using human liver microsomes.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2023); 224; 115154

IF₂₀₂₂ = 3,4; IF Quartile = Q2; AIS Quartile = Q2

Příloha č. 4

Novak M., Vajrychova M., Koutsilieri S., Sismanoglou D., Koblíková T., Prchal L., Svobodová B., Korabecný J., Zarybnický T., Raisová-Stuchlíková L., Skalová L., Lauschke V. M., Kucera R., Soukup O.

Tacrine first phase biotransformation and associated hepatotoxicity; a possible way to avoid quinone methide formation.

ACS Chemical Biology (2023); in press

IF₂₀₂₂ = 4,0; IF Quartile = Q2; AIS Quartile = Q1