

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**PREDIKCE PRŮCHODU TAKRIN-BQCA DERIVÁTŮ
PŘES HEMATOENCEFALICKOU BARIÉRU**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Ondřej Soukup, Ph.D.

Hradec Králové, 10. května 2017

Nikol Vykoukalová

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

V Hradci Králové dne 10. května 2017

.....

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému konzultantovi PharmDr. Ondřeji Soukupovi Ph.D. a vedoucímu diplomové práce prof. PharmDr. Františkovi Štaudovi Ph.D. za vedení a cenné rady, které mi poskytli v průběhu vypracovávání diplomové práce a zejména za ochotu, vstřícnost a čas věnovaný společným konzultacím. Zároveň bych ráda poděkovala všem pracovníkům Centra biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové, kteří se taktéž nemalou měrou podíleli na vzniku diplomové práce. V neposlední řadě patří velký dík i mé rodině a přátelům, kteří mne podporovali nejen během tvorby diplomové práce, ale i v průběhu celého studia, čehož si velmi vážím.

Obsah

1. ÚVOD.....	- 1 -
2. TEORETICKÁ ČÁST	- 2 -
2.1 Alzheimerova choroba.....	- 2 -
2.1.1 Historie Alzheimerovy choroby	- 2 -
2.1.2 Epidemiologie	- 3 -
2.1.3 Familiární a sporadická Alzheimerova choroba	- 3 -
2.1.4 Etiopatogeneze Alzheimerovy choroby.....	- 4 -
2.1.5 Rizikové faktory Alzheimerovy choroby	- 5 -
2.1.6 Protektivní faktory.....	- 6 -
2.1.7 Současně užívaná terapie.....	- 6 -
2.1.8 Doplnčková terapie	- 9 -
2.2 Hematoencefalická bariéra	- 13 -
2.3 In vivo metody pro studium prostupu látek přes hematoencefalickou bariéru.....	- 16 -
2.3.1 Parametr kvantifikace log BB	- 16 -
2.3.2 Metody provedení: perfúze mozku, intravenózní injekce, kvantitativní autoradiografie.....	- 16 -
2.3.3 Mikrodialýza	- 17 -
2.3.4 Tomografické metody	- 18 -
2.3.5 Magnetická rezonance	- 18 -
2.4 In vitro metody prostupu skrz HEB.....	- 18 -
2.4.1 Buněčné kultury.....	- 19 -
2.4.2 Zkouška paralelního umělého membránového pronikání (PAMPA)	- 20 -
2.5 Analytické metody k in vitro/in vivo studiu.....	- 21 -
2.5.1 Ukazatele permeability	- 21 -
2.5.2 Scintilační měření.....	- 21 -
2.5.3 Kapilární elektroforéza	- 21 -
2.5.4 Kapalinová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (LC-MS)	- 22 -
2.6 M2 látky v PAMPA eseji	- 22 -
2.7 Pluronic F-127	- 23 -
3. CÍL PRÁCE.....	- 24 -
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 25 -

4.1	Použitý materiál.....	- 25 -
4.1.1	Přístroje a pomůcky:.....	- 25 -
4.1.2	Chemikálie:	- 25 -
4.1.3	Standardní látky.....	- 26 -
4.1.4	Nové testované látky	- 26 -
4.2	Pracovní postup	- 32 -
4.2.1	Protokol zkoušky PAMPA	- 32 -
4.2.2	Postup měření na spektrofotometru:.....	- 33 -
4.2.3	Hodnoty log P a log D.....	- 33 -
4.2.4	Rozpustnost látek v PBS a roztoku PBS/F-127 pomocí LC-MS.....	- 34 -
4.3	Analýza dat a statistické zhodnocení.....	- 36 -
5.	VÝSLEDKY.....	- 38 -
5.1	Stanovení látek v PBS	- 38 -
5.2	Využití F-127 jako kosolvent	- 42 -
5.2.1	Vliv lipofility léčiva na jeho rozpustnost	- 45 -
5.3	Zkouška PAMPA za využití F-127	- 47 -
5.3.1	Permeabilita Pe.....	- 49 -
6.	DISKUSE	- 55 -
7.	ZÁVĚR.....	- 60 -
8.	POUŽITÁ LITERATURA	- 61 -

POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český význam
Aβ	β -amyloid	β -amyloid
APP	Amyloid precursor protein	Prekurzor amyloidního proteinu
BQCA	Benzyl Quinolone Carboxylic Acid	Benzylester kyseliny chinolonkarboxylové
CNS	Central Nervous System	centrální nervová soustava
DMSO	Dimethylsulfoxide	dimethylsulfoxid
F-127	Pluronic	pufr
HEB	Hematoencephalic barrier	Hematoencefalická bariéra
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass spectrometry	Kapalinová chromatografie – Hmotnostní spektrometrie
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay	Zkouška paralelního umělého membránového pronikání
PBL	Polar Brain Lipid	Extrakt lipidu z mozku vepře
PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	Pufrovaný fyziologický roztok

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením predikce prostupu takrinových BQCA derivátů, potenciálních léčiv Alzheimerovy choroby, přes hematoencefalickou bariéru (HEB) pomocí metody PAMPA (paralelní umělé membránové pronikání). Pokusili jsme se predikovat prostupnost pomocí koeficientu permeability, studovat závislost mezi rozpustností sloučenin a jejich hodnotou log P (resp. log D) a následný význam těchto ukazatelů k predikci jejich průchodu HEB. K solubilizaci sloučenin byl z důvodu vysoce lipofilní povahy všech testovaných látek použit roztok 1% Pluronicu F-127 v PBS, který již látky svou schopností tvořit micely dokázal solubilizovat a zajistit mj. také jejich konstantní koncentraci v průběhu měření. Vlastní stanovení prostupu se provádělo tak, že se roztoky sloučenin nanasly do donorové části mikrotitračních desek (tzv. sendvičového uspořádání), na jejímž dně byl nanesen roztok lipidu izolovaný z mozku vepře (PBL), který slouží jako membrána simulující fosfolipidovou membránu endotelu mozkových kapilár. Touto membránou procházel roztok látky do akceptorové části systému, ze které se poté měřila absorbance na spektrofotometru a zaznamenávala se výsledná hodnota permeability v daných časových intervalech. Získané výsledky jsme korelovali ke standardním léčivům se známým průchodem skrze HEB a k fyzikálně-chemickým vlastnostem. Výsledky získané z měření v 1% roztoku F-127 byly extrapolovány k výsledkům v PBS pomocí sady standardních léčiv stanovených v obou rozpouštědlech. Na základě těchto údajů jsme dospěli k závěru, že většina studovaných látek vykazovala rozsah permeability v PBS s hodnotou mezi $2-4 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$, z čehož lze usuzovat omezený průnik skrz HEB. Pouze 2 studované látky udávaly hodnoty dostačující k přestupu přes HEB. Potvrdili jsme také, že pasivní transport sloučenin nebývá vždy závislý pouze na lipofilitě, ale i další parametry jako molekulová hmotnost jednotlivých látek, míra ionizace či koncentrační gradient mohou hrát významnou roli. Stejně tak i účinnost Pluronicu F-127 jako kosolventu nelze chápat jako přísně závislou na lipofilitě testovaných M2 látek.

Klíčová slova: Alzheimerova choroba, takrin, PAMPA, hematoencefalická bariéra

ABSTRACT

This master thesis deals with the determination of permeability prediction for tacrine BQCA derivatives, potential drugs for Alzheimer's disease, through the blood-brain barrier (BBB) using the method of parallel artificial membrane penetration (PAMPA). We attempted to predict the central bioavailability by the permeability coefficient, to study the relationship between the solubility of the compounds and their log P (or Log D) and the subsequent significance of these data for the prediction of their passage through the blood-brain-barrier. A solution of 1% Pluronic F-127 in PBS was used to solubilize compounds and to ensure the constant concentration during the measurement. The assay was performed so that the solutions of compounds were applied to the donor part of microtiter plate (so-called sandwich arrangement), the bottom compartment was covered by a solution of a polar brain lipid isolated from pig brain (PBL), which serves as a membrane simulating the phospholipid membrane of the brain capillary endothelium. The solution of the substance was allowed to diffuse into the acceptor part of the system from which it was then sampled at specific time intervals and measured on a spectrophotometer. The results were then correlated to commonly used drugs with known passage through the BBB and to the physical-chemical properties. The results obtained from measurements in a 1% F-127 solution were extrapolated to the results in PBS using a set of standard drugs evaluated in both solvents. Based on these data, we conclude that most of the tested substances showed the extent of permeability in PBS represented by the value between $2-4 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$, suggesting limited penetration through the BBB. Only two tested agents reported a value sufficient to permeate through the BBB. We also demonstrate the fact that passive transport is not always dependent only on the lipophilicity but another parameters such as the molecular weight of each substance, the degree of ionization or concentration gradient can play a crucial role. Likewise, the effectiveness of Pluronic F-127 as the solvent is not strictly dependent on the lipophilicity of the tested compounds.

Keywords: Alzheimer's disease, tacrine, PAMPA, blood-brain-barrier

1. ÚVOD

Alzheimerova choroba se v posledních letech v populaci objevuje stále častěji a zařadila se tak, vedle rakoviny, hypertenze, diabetu mellitu aj., mezi současné civilizační onemocnění. Jedná se o postupnou degeneraci a zánik neuronů v mozku, jehož výsledkem je zhoršení kognitivních funkcí, změny chování a postupná ztráta krátkodobé paměti, což pacientovi významně znemožňuje samostatně provádět běžné denní činnosti. V současné době jsou pro terapii schválena pouze léčiva zpomalující progresi choroby, inhibitory acetylcholinesterázy (AChE) a memantin. První jmenované působí inhibicí enzymu degradujícího acetylcholin, jehož deficit v mozku způsobuje výše uvedené projevy nemoci. Patří sem donepezil, galantamin a rivastigmin. Jejich účinnost se však zdá být v monoterapii nedostačující. Memantin, antagonist N-metyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů, znemožňuje vazbu glutamátu na tento receptor a zabraňuje jeho následné neurotoxicitě. Často se používá v kombinaci s některým z inhibitorů AChE pro zvýšení účinku.

Tato diplomová práce je zaměřena na deriváty takrinu, tedy prvního objeveného inhibitoru AChE, kterému pro používání v klinické praxi brání výrazná hepatotoxicita a gastrointestinální diskomfort. V souvislosti s tímto poznáním byl připraven jeho méně toxický derivát zvaný 7-MEOTA. Pro účely této práce bylo syntetizováno několik dalších derivátů, tzv. hybridních léčiv, u kterých bylo hlavním úkolem predikovat prostup přes HEB *in vitro*.

Existuje několik metod, kterými se stanovení predikce penetrace látek přes HEB provádí. Mezi *in vivo* metody řadíme například stanovení log BB jako ukazatele rovnovážné distribuce mezi krví a mozkiem, které se provádí aplikací intravenózní injekce či kvantitativní autoradiografií s měřením dosažené koncentrace aplikované látky v mozku, mikrodialýzou či tomografickými metodami PET a SPECT. Většina metod je však materiálně a finančně velmi nákladná a využívá laboratorní zvířata. *In vitro* metody zahrnují ukazatele permeability (P_e) získané scintilačními technikami, kapilární elektroforézu nebo kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Uvedené metody jsou také finančně nákladné, řada z nich vyžaduje drahé přístrojové vybavení. Proto jsme se my rozhodli použít metodu PAMPA, která vyniká svou relativní jednoduchostí, časovou nenáročností a spotřebou jen malého množství vzorku. Na druhou stranu poskytuje pouze limitovanou predikci prostupnosti látek do CNS.

2. TEORETICKÁ ČÁST

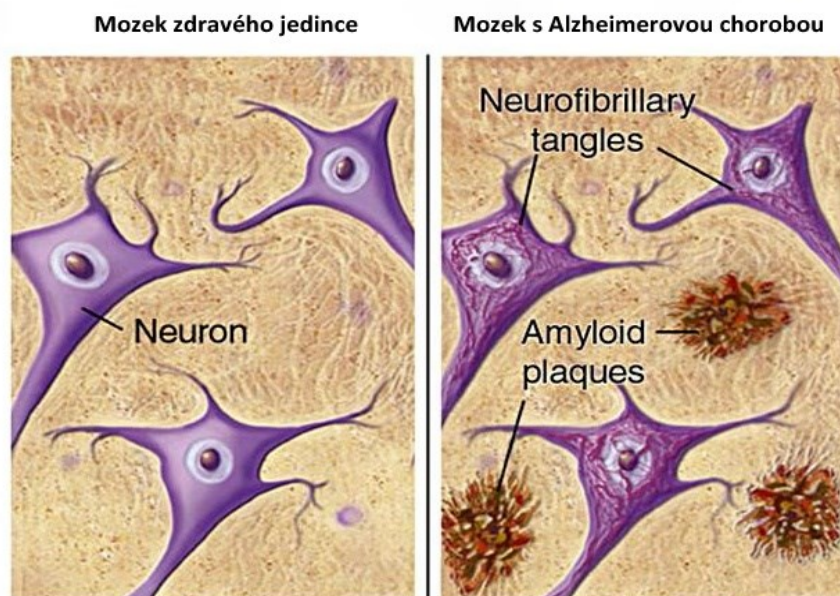
2.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (Alzheimer's Disease, AD) je charakterizována jako chronické, neurodegenerativní onemocnění způsobené postupným zánikem neuronů v mozku s následnými patologickými změnami. Patří mezi nejčastější příčinu demence u pacientů vyššího věku. Demence je definována jako progresivní kognitivní zhoršení paměti spojené s neschopností vykonávat běžné denní aktivity (O'Brien and Wong, 2011).

AD se nejčastěji projevuje ztrátou krátkodobé paměti, kdy má pacient uchované vzpomínky z minulých let, ale není schopen vybavit si činnosti prováděné v předchozích dnech. Dalšími typickými projevy v prvotním stádiu jsou poruchy řeči nebo časové a místní orientace, často mluví velmi omezeně, potichu a stroze. V pokročilém stádiu často nastává agresivní chování vůči okolí, pacient nevěří osobám kolem sebe, nepoznává je a útočí na ně slovně či fyzicky. Mohou se objevit i halucinace a bludy. V konečném stádiu je již pacient plně odkázaný na pomoc druhé osoby, jelikož není samostatně schopen běžných činností, má potíže s inkontinencí a chůzí. V důsledku prodlužování délky života v celosvětové populaci stoupá počet jedinců trpících touto chorobou a stává se tak v současnosti velmi závažným zdravotním problémem (Nevsimalova S, 2002).

2.1.1 Historie Alzheimerovy choroby

Název onemocnění pochází z příjmení Aloise Alzheimerera, který v roce 1907 po pitvě pacientky s progresivními duševními poruchami zachytil 2 zásadní patologické změny v nervové soustavě: vznik neurofibrilárních klubek v neuronech a extracelulárních amyloidních plaků, znázorněných na Obr. 1. Tento nález byl až po několika desítkách let izolován a v roce 1987 byl pojmenován jako amyloid beta ($A\beta$) (O'Brien and Wong, 2011). Přestože nebyl doposud vysvětlen původ těchto patologických lézí, předpokládá se, že změny ve vzniku a fungování těchto amyloidních plaků by mohly být hlavním iniciačním faktorem nemoci (Mayeux and Stern, 2012).



Obr. 1: Mozek neuronů zdravého jedince na obrázku vlevo a mozek jedince postiženého Alzheimerovou chorobou na obrázku vpravo s viditelnými plaky amyloidními a neurofibrilárními klubky uvnitř neuronů. Modifikováno dle: (Buratov, 2014).

2.1.2 Epidemiologie

Globální prevalence demence byla v roce 2010 odhadnuta na 4,7 % pacientů ve věku 60 let a více, tedy přibližně 35,6 milionů. Přičemž podstatně více bývají demencí postiženy ženy zřejmě kvůli tomu, že se obecně dožívají vyššího věku. Z těchto údajů se odhaduje, že 60-80 % případů demence je klasifikovaných jako AD. Předpokládá se, že každých 20 let se tento počet zdvojnásobí, tedy v roce 2030 lze očekávat diagnózu demence u 65,7 milionů pacientů. Jak již bylo řečeno, tento rapidní nárůst je dán zejména rostoucím stárnutím populace (Sosa-Ortiz et al., 2012).

2.1.3 Familiární a sporadická Alzheimerova choroba

AD se dále dělí na 2 typy. První z nich je geneticky podmíněn, jedná se o autozomálně dominantní familiární Alzheimerovu chorobu a bývá u pacientů velmi vzácná. Předpokládá se zde mutace tzv. presenilního genu 1 na chromozomu 14 (nejčastější mutace), presenilního genu 2 na chromozomu 1 a genu prekursoru amyloidního proteinu (APP) na chromozomu 21. Populačně početnější je tzv. sporadická AD, jejíž příčina zřejmě souvisí se stoupajícím věkem

pacientů, a tedy přidruženými zdravotními problémy. Hovoří se také o tom, které buněčné metabolické abnormality mohou být zodpovědné za věkem podmíněnou sporadickou AD (Maurer and Hoyer, 2006).

2.1.4 Etiopatogeneze Alzheimerovy choroby

V centru pozornosti etiopatogeneze je především deficit glukózy v mozku – typicky pro věk 70 let a více až o 25 % - neboli poruchy energetického metabolismu. Doposud však není jasné, stejně jako u jiných teorií etiopatogeneze AD, zda se jedná o primární příčinu či průvodní jev onemocnění. Snížená utilizace glukózy v mozku u sporadické AD může být zprostředkována sníženou schopností enzymu štěpit glukózu a podílet se na vzniku a degradaci acetyl-CoA. Poruchy energetického metabolismu mohou způsobovat deficit acetylcholinu nedostatečnou tvorbou acetyl-CoA, který se významně podílí na jeho vzniku. Tímto byla popsána jedna z prvních hypotéz vzniku AD – cholinergní hypotéza. Ta je charakterizovaná snížením cholinergních funkcí v CNS způsobeným významnou ztrátou acetylcholinu, která vyústí v poškození kognitivních funkcí (Cummings and Kaufer, 1996).

Acetyl-CoA je mj. součástí dráhy syntézy cholesterolu, hlavní složky membrán, a při jeho nedostatku dochází k poruše funkce buněčné membrány. Dále také dochází ke změně poměru nenasycených (snížení) ku nasyceným mastným kyselinám (zvýšení) v buněčné membráně, což vede k poruše její funkce a fluidity. Předpokládá se tedy, že vzájemný vztah mezi poruchou energetického metabolismu a defektem membrány tvoří základ jak pro indukci metabolismu amyloidního prekurzorového proteinu (APP), zodpovědného za tvorbu A β , tak pro hyperfosforylaci tau-proteinu ničícího buněčné struktury poškozením mikrotubulů (Maurer and Hoyer, 2006).

Dostáváme se tak ke druhé tzv. amyloidní hypotéze. APP je transmembránový glykoprotein syntetizovaný v neuronech a poté je uchováván v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Odtud je transportován buď na povrch buněk, kde dochází k okamžité proteolýze prostřednictvím enzymu α -sekretázy a následně γ -sekretázy. Druhou minoritní možností je transport APP do endosomálního kompartmentu, kde dochází k jeho štěpení pomocí β -sekretázy na rozpustný fragment, který je v zápětí štěpen γ -sekretázou za vzniku nerozpustného A β . Ten je přepraven do extracelulárního prostoru, kde se hromadí a tvoří se shluky, někdy označované jako tzv. senilní plaky. Na ty organismus reaguje jako na cizorodá tělesa a dochází tak k vyplavení astrocytů a mikroglíí a rozvoji sterilního zánětu (zánětlivá hypotéza). V rámci spuštění obranných imunitních reakcí dochází k uvolnění cytokinů

(především interleukinů a tumor nekrotizujícího faktoru α : TNF α), které indukují kaskádu chemických reakcí vedoucí ke smrti neuronů. Mechanismem smrti je pravděpodobně apoptóza, která je spuštěna mj. oxidativním stresem prostřednictvím A β (oxidativní hypotéza).

Vědecky bylo zjištěno, že A β ovlivňuje štěpení a fosforylaci tau-proteinu, což je zásadní pro vznik neurofibrilárních klubek (NFT). Tato klubka jsou charakterizována jako intracelulární nerozpustné inkluze, tvořené primárně ze štěpených a hyperfosforylovaných forem tau-proteinu, který je pravděpodobně hlavním mediátorem toxicity A β .

Jak již bylo řečeno, nepatrné množství (okolo 10 %) APP v mozku je kontinuálně metabolizováno na A β . Jedním z alternativních vysvětlení pro kumulaci A β by mohl být větší podíl tohoto alternativního štěpení APP. Je potřeba však zdůraznit, že určité procento pacientů trpících AD nemá nález v podobě amyloidních plaků, pouze neurofibrilárních klubek. Toto zjištění dokládá několik studií (Chetelat et al., 2016) (Crary et al., 2014), ovšem je na místě zmínit, že přesného stanovení absence A β je možné docílit až pitvou, nikoliv během života pacienta, kdy se tato vyšetření prováděla.

2.1.5 Rizikové faktory Alzheimerovy choroby

Mezi nejčastěji uváděné rizikové faktory se řadí cerebrovaskulární onemocnění zahrnující infarkt, mozkové krvácení, kortikální změny v důsledku hypoperfúze a vaskulopatie. Možný mechanismus, který by mohl vést k poškození kognitivních funkcí, je destrukce parenchymu mozku s atrofií a poškození důležitých oblastí vedoucích k infarktu thalamu a zvýšené depozici A β . Při ischemii a následné hypoxii například dochází k nadměrné expresi cyklin-dependentní kinázy 5 (cdk5), ta poté zvýší hladinu β -sekretázy, jež stimuluje APP, se kterým je spojena zvýšená tvorba A β .

Riziko AD lze očekávat také u pacientů s anamnézou hypertenze, dyslipidémie či kouření. Všechny tyto faktory přispívají k narušení funkce a průchodnosti cév, což vede k omezení přísunu kyslíku a glukózy do mozku.

Další neméně významnou chorobou, která zvyšuje riziko AD až dvojnásobně oproti předešlým, je diabetes mellitus 2. typu. Hyperinsulinémie narušuje clearance A β v mozku kompeticí o enzym metabolizující insulin (Mayeux and Stern, 2012).

Všechny výše zmíněné rizikové faktory postihují především populaci starší 60 let, a proto by se dalo říci, že tím zásadním rizikovým faktorem je právě věk.

2.1.6 Protektivní faktory

Existují také faktory, které snižují riziko Alzheimerovy choroby. U jedinců s vysokým dosaženým vzděláním, pestrým životním stylem a několika volnočasovými aktivitami byl zjištěn nižší výskyt AD (Evans et al., 1989).

Zvýšený přísun nasycených mastných kyselin v potravě zvyšuje hladinu LDL, čímž se podněcuje riziko cévních mozkových příhod, a tedy i AD. Proto konzumace omega-3 mastných kyselin, které umí naopak snižovat hladinu LDL v krvi, je nezbytným dietním opatřením v raném stadiu AD.

Fyzická aktivita je dalším přínosným faktorem, která dle studií na zvířatech dokáže zlepšit učení u mladých i starších druhů, podpořit mozkové cévní zásobení a stimulovat odolnost vůči úrazům mozku. Dle jedné metastudie, 8 z 11 randomizovaných studií o pohybových aktivitách u starších pacientů bez známé kognitivní poruchy uvedlo, že aerobik jako vybraný druh pohybové aktivity zlepšil jejich kognitivní funkce (Angevaren et al., 2008).

2.1.7 Současně užívaná terapie

Současná terapie je bohužel omezena pouze na zmírnění projevů, zpomalení progresu a zlepšení kvality života. Terapeuticky se tedy momentálně používají a jsou klinicky schváleny agenturou Food And Drug Administration (FDA) 2 skupiny léčiv: inhibitory cholinesterázy a antagonisté NMDA receptoru.

2.1.7.1 *Inhibitory acetylcholinesterázy*

Použití těchto sloučenin v terapii AD vychází z patologického nálezu v mozku pacientů, kterým je výrazný deficit acetylcholinu (ACh) a cholinacetyltransferázy (CAT), enzymu produkujícího acetylcholin. Proto byly vyvinuty látky, jejichž mechanismem účinku je blokáda acetylcholinesterázy (AChE), tedy jednoho ze 2 enzymů metabolizujícího acetylcholin. Často se můžeme setkat s pojmem kognitiva, jelikož pravděpodobně zlepšují pozornost a paměťové schopnosti. V současné době jsou schválena 3 léčiva patřící do této skupiny: donepezil, galantamin a rivastigmin. První 2 sloučeniny selektivně blokují AChE, u rivastigminu byla navíc prokázána inhibice butyrylcholinesterázy (BuChE) – dalšího enzymu rozkládajícího acetylcholin. Jejich limitujícími faktory jsou především omezená účinnost a časté nežádoucí účinky jako nadměrná hypersekrece žláz a gastrointestinální

dyskomfort. Ovšem objev těchto léčiv byl zásadní pro vývoj dalších molekul v terapii AD (Greenlee et al., 2001).

Donepezil je selektivní, nekompetitivní a reversibilní inhibitor AChE, chemicky se řadí mezi piperidinové deriváty. Z výše uvedených léčiv je nejúčinnější a pacienty je nejlépe snášen. Používá se na mírné až středně těžké formy nemoci, a to jak v monoterapii, tak i v kombinaci s memantinem (viz dále). Pro klinickou praxi je výhodný jeho dlouhý biologický poločas (70 hod.), což umožňuje dávkování pouze 1x denně. Nežádoucí účinky na gastrointestinální trakt se objevují nejčastěji během zahájení terapie a po čase vymizí (Jelic and Darreh-Shori, 2010).

Druhým selektivním inhibitorem AChE je galantamin, isochinolinový alkaloid původně izolovaný ze sněženky z čeledi *Amaryllidaceae*, nyní se již vyrábí synteticky. Stejně jako donepezil je nekompetitivním a reverzibilním inhibitorem AChE. Na rozdíl od něj je však také alosterickým modulátorem nikotinových receptorů pro acetylcholin, což pravděpodobně ještě zlepšuje jeho účinek. Působením na tyto receptory dochází navíc k regulaci dalších neurotransmiterů, jako například serotoninu, noradrenalinu, GABA (kyselina γ -aminomáselné) a glutamátu, které se významně podílejí na ovlivnění nálady a psychického stavu člověka. Co se však týče inhibice acetylcholinesterázy, ta se zdá být dle studií poměrně slabá, navíc se během terapie galantaminem objevovaly u pacientů časté gastrointestinální potíže, proto je nutné začínat od nízkých dávek a postupně je zvyšovat k dávkám terapeutickým (Marco-Contelles et al., 2006). Vzhledem ke krátkému biologickému poločasu (7 hod.) je nutné dávkování 2x denně, nebo lze použít retardovanou formu léčiva v jedné denní dávce.

Posledním z trojice léčiv je rivastigmin, strukturně patřící mezi deriváty karbamátů. Ten se kromě inhibice AChE může pyšnit také inhibicí butyrylcholinesterázy. Hovoří se o něm též jako o pseudo-ireverzibilním inhibitorem těchto enzymů (tzn. v molekule cholinesterázy dochází ke kompetitivnímu vytěsnění Ach inhibitorem, který je poté sám enzymy odbouráván) (Jirak, 2006). Jeho zásadní nevýhodou pro praxi je vysoký first-pass efekt po perorálním podání, kvůli čemuž je jeho biologická dostupnost kolem 35 %. Jeho metabolity prakticky postrádají schopnost inhibovat AChE (Polinsky, 1998). Perorálně se podává 2x denně, biologický poločas je kolem 1 hod. V rámci zvýšení jeho účinnosti a snášenlivosti bylo zjištěno, že jeho malá molekula je výhodná pro absorpci přes kůži, proto byly vyvinuty transdermální náplasti s rivastigminem, díky nimž se vyhneme first-pass efektu a zvýší se tak biologická dostupnost. U pacientů s transdermální lékovou formou bylo též

zaznamenáno snížené hlášení nežádoucích účinků na gastrointestinální trakt. Přestože v transdermální náplasti je jeho poločas kolem 3 hod., podává se pouze v jedné denní dávce, jelikož jeho absorpce je výrazně zpomalena oproti absorpci při perorálním podání. Dalším benefitem oproti administraci per os je snížení dávky, kdy dávka 6mg/den rivastigminu v kapsli odpovídá dávce 4,6mg/den rivastigminu v transdermální náplasti (Winblad and Machado, 2008).

Vůbec prvním inhibitorem AChE zavedeným do klinické praxe byl akridinový derivát takrin (viz Obr. 3). Stejně jako rivastigmin je reverzibilním inhibitorem obou cholinesteráz. Důvodů, proč ho nenajdeme v současné terapii AD je hned několik. Jeho biologický poločas je kolem 2 hod., což vyžaduje velmi nepraktické dávkování 4x denně, biologická dostupnost se pohybuje v rozmezí 10–30 %. Významně se váže na bílkoviny plazmy (až z 55 %) a je silně metabolizován cytochromem P-450, což vede k vysokému riziku lékových interakcí. Dalším výrazným limitem pro použití v praxi je jeho vysoký potenciál k hepatotoxicitě, která se stala důvodem vysazení léčiva (Davis and Powchik, 1995).

2.1.7.2 Antagonisté NMDA receptorů

NMDA receptory jsou receptory pro N-metyl-D-aspartátovou kyselinu či glutamát, který je spolu s aspartátem excitačním neurotransmiterem v CNS, podílejícím se však také při nadměrné stimulaci na neurotoxicitě. NMDA receptory zasahují mj. do procesů učení a paměti, ale také způsobují zejména degeneraci neuronů a jejich následnou smrt jejich nadměrnou stimulací (Moriyoshi and Masu, 1991).

Strategií léčby bylo tedy najít antagonistu NMDA receptorů, který by neuronální poškození, vyúsťující mj. v Alzheimerovu chorobu, potlačil. Zástupcem této skupiny je memantin. Je označován jako „otevřený blokátor kanálů“, jelikož může vstoupit dovnitř kanálu a blokovat průtok v něm až po jeho otevření (Johnson and Kotermanski, 2006).

Dle jedné studie zabývající se účinností a bezpečností memantinu v terapii AD bylo zjištěno, že jeho účinnost je velmi uspokojivá, došlo ke zlepšení kognitivních funkcí a chování pacientů s AD po 12 týdnech terapie. Byl také velmi dobře tolerován, z nežádoucích účinků se vyskytla občasná nauzea, závratě, neklid a únava (Winblad and Poritis, 1999). Podává se perorálně u středně těžkých forem AD, u těžkých forem se s výhodou přidává do kombinace s donepezilem (Tariot et al., 2004). I tato kombinace má však pouze dočasný efekt a nevede k trvalému zlepšení.

2.1.8 Doplnčková terapie

2.1.8.1 Látky stimulující metabolismus v CNS: Nootropika a další

Jak již bylo řečeno v etiopatogenezi Alzheimerovy choroby, glukóza je důležitým zdrojem energie pro neurony a její metabolismus je u starší populace narušen. Proto se výzkum zaměřil také na zlepšení metabolismu glukózy v mozku použitím nootropik, které navíc zvyšují využití kyslíku zlepšením prokrvení mozku.

Prvním objeveným léčivem z této skupiny látek byl piracetam. Jeho mechanismus účinku není zcela objasněn, není znám žádný receptor, ke kterému by se vázal ani žádný enzym či transportní systém, který by ovlivňoval (Muller et al., 1999). Víme však, že výrazně zlepšuje metabolismus CNS, zvyšuje uvolňování acetylcholinu a tím zlepšuje kognitivní funkce u starších pacientů s demencí (Weinstock, 1995). Ovšem jeho účinnost v léčbě AD nebyla studiemi dostatečně prokázána. Jeho deriváty pramiracetam, oxiracetam či aniracetam jsou prozatím předmětem studií (Gouliaev and Senning, 1994).

Do nootropik se řadí též pyritinol, derivát vitamínu B₆, jehož mechanismus zahrnuje zvýšení utilizace glukózy v mozku a omezení působení volných radikálů. Dle studií provedených na pacientech s mírnou až střední intenzitou AD bylo prokázáno zlepšení bdělosti. Také byl pacienty velmi dobře tolerován a bylo zaznamenáno pouze nepatrné množství nežádoucích účinků. Ovšem jeho vliv na zlepšení celkové progrese onemocnění je velmi omezen (Fischhof P.K., 1992).

Ginkgo biloba, konkrétně extrakt z listů rostliny, se v dnešní době objevuje v rámci podpůrné terapie demence čím dál častěji pro svůj vysoký obsah flavonoidů. Ty významně působí proti oxidativnímu stresu. Dále ginkgo působí jako antagonist PAF faktoru (faktor ovlivňující krevní destičky) a tím potlačuje zánětlivý proces, který je jednou z hypotéz vzniku AD (Oken et al., 1998). Využívá se proto především v terapii cévních mozkových poruch. Zlepšení kognitivních funkcí a zpomalení progrese AD užíváním ginkgo biloby však nebylo doposud uspokojivě prokázáno (Sabbagh, 2009).

2.1.8.2 Scavengery kyslíkových radikálů

Další hypotézou, která by mohla hrát roli v patogenezi Alzheimerovy choroby a byla již okrajově zmíněna výše, je oxidativní stres. V současné době je známo, že samotný oxidativní stres nemůže vyvolat AD. Produkce volných radikálů je podmíněna sledem několika patologických mechanismů, ze kterých lze jmenovat přítomnost A β , neuritické

plaky, nedostatek elektronů v mitochondriích a narušená rovnováha enzymů zasahujících proti volným radikálům. Oxidativní stres lze redukovat pomocí tzv. scavengerů kyslíkových radikálů či antioxidantů. Mezi scavengery patří například již zmíněná ginkgo biloba, vitamin A, vitamin C, vitamin E či idebenon. Antioxidanty se uplatňují již ve fázi vzniku radikálů a snižují jejich hladiny. Nejznámějším zástupcem je selegilin, inhibitor enzymu MAO-B (monoaminoxidáza B, enzym katabolizující katecholaminy) (Rösler et al., 1998). Zda oxidativní stres hraje roli v patogenezi AD natolik důležitou, aby se do její terapie tyto látky zahrnuly, je prozatím předmětem diskuzí.

2.1.8.3 Látky stimulující syntézu NGF

NGF (Nerve growth factor), v překladu nervový růstový faktor, hraje důležitou roli v životaschopnosti cholinergních neuronů v CNS. Dle několika vědeckých studií bylo zjištěno, že deficit NGF receptorů by mohl předcházet Alzheimerově chorobě, což by vysvětlovalo selektivní degeneraci těchto neuronů. Po intrakraniálním podání NGF jednomu z pacientů s Alzheimerovou chorobou došlo ke zlepšení verbální a epizodické paměti a zvýšil se průtok krve v mozku. Nicméně kognitivní funkce zůstaly beze změny, což se ovšem přičítalo již dlouholetému trvání AD u pacienta. Relativně nové sloučeniny, propentofylin a TMQ = 6-(4-hydroxybutyl)-2,3,5-trimethyl-1,4-benzoquinon stimulují syntézu NGF v astrocytech a selektivně zvyšují jeho hladinu v hippocampu (Weinstock, 1995). Účinnost TMQ byla prokázána *in vitro* i *in vivo*, kde zvýšil hladinu NGF a obnovil sníženou aktivitu cholinacetyltransferázy (Nitta et al., 1993). Tyto molekuly by mohly představovat selektivnější a méně toxickou léčbu porušené paměti související se ztrátou cholinergních neuronů a mohly by přinést benefit u AD diagnostikované v raných stádiích onemocnění (Weinstock, 1995).

2.1.8.4 NSAID's

V posledních letech se v patogenezi AD dostává do popředí i hypotéza vyplývající ze skutečnosti, že zánět v CNS je primárním mechanismem neurodegenerativních změn a poškození mozku. V souvislosti s tím poukázaly epidemiologické studie na to, že běžně užívaná nesteroidní antiflogistika, s výjimkou kyseliny acetylsalicylové, mohou u starších pacientů přispět k zábraně rozvoje Alzheimerovy choroby redukcí aktivovaných makroglíí, což následně vede ke snížení uloženého A β . Nicméně použití v klinické praxi se

při dlouhodobém užívání ukázalo jako rizikové a u několika pacientů bylo nutné přerušit terapii z důvodu závažných nežádoucích účinků typických pro NSAIDs (Sabbagh, 2009).

2.1.8.5 *Inhibitory fosfodiesterázy*

Vzhledem k nepříznivým výsledkům při užívání NSAIDs se poté výzkum soustředil na hledání molekul zprostředkávajících tlumení zánětu, které by nepředstavovaly pro pacienta tak významné riziko a zůstaly by stále dostatečně efektivní v léčbě AD. Proto se zaměřili na inhibitory fosfodiesterázy 7 nacházející se v buňkách mozku, jejichž mechanismus účinku spočívá v inhibici tohoto enzymu, který rozkládá cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). (Morales-Garcia et al., 2014) Jednou z funkcí cAMP je neuroprotektce v souvislosti s regulací aktivity buněk zánětu. (Perez-Gonzalez et al., 2013) Zvýšené množství cAMP aktivuje proteinkinázu A, ta vede k fosforylaci enzymu GSK-3 β (glykogensynthasa kinasa-3 β), který zodpovídá za fosforylaci tau-proteinu podílejícího se na vzniku neurofibrilárních plaků (Lovestone et al., 2015). Jejich použití je ovšem prozatím stále předmětem zkoumání.

2.1.8.6 *Statiny*

Zvýšená hladina cholesterolu je často spojována se zvýšením rizika Alzheimerovy choroby. Dlouhodobým užíváním inhibitorů hydroxymethylglutaryl-CoA reduktázy bylo zaznamenáno snížení rizika rozvoje AD až o 75 %. Hypercholesterolemie navíc podmiňuje syntézu a ukládání A β , proto snížením hladiny cholesterolu v krvi docílíme i snížení deposit těchto amyloidních plaků. Ovšem klinické studie ani u statinů nepodalý dostatečně přesvědčivé výsledky (Sabbagh, 2009).

2.1.8.7 *Tramiprostat*

Tramiprostat je modifikovaná struktura taurinu a v praxi se uplatňuje jako antiagregans. Další funkcí je vazba A β a zábrana jeho ukládání a ve formě amyloidních plaků. Jelikož je amyloidní kaskáda jednou z nejdiskutovanějších hypotéz v patogenezi AD, byla terapie tramiprostatem široce zkoumána. Přestože se II. fáze klinických studií jevila velmi slibně, výsledky III. fáze přinesly velké zklamání – tramiprostat byl téměř srovnatelný s placebem. Vysvětlením pro tyto nelichotivé výsledky je fakt, že tramiprostat podmiňuje agregaci tau-proteinu, primární komponenty neurofibrilárních plaků, které hrají klíčovou roli v patogenezi AD (Sabbagh, 2009).

2.1.8.8 Tideglusib

Nově objeveným a velmi nadějným léčivem, které se v roce 2015 nacházelo ve II. fázi klinických studií, je sloučenina ze skupiny tiadiazolidinonů s názvem tideglusib. Svým mechanismem účinku se řadí mezi chorobu modifikující léčiva, ten spočívá v ireverzibilní inhibici enzymu GSK-3 β , jehož funkcí je, jak již bylo řečeno výše, hyperfosforylace tau-proteinu podílejícího se na vzniku neuritických plaků. Uplatňuje se mj. též v neurodegenerativních procesech jako zánět, apoptóza či narušený axonální transport. V roce 2015 byla provedena dvojité zaslepená randomizovaná studie, od které vědci očekávali slibné výsledky, ty však neprokázaly dostatečnou účinnost. I přesto, že byl prokázán výrazný efekt na inhibici hyperfosforylace tau-proteinu, snížené ukládání A β a následnou sníženou ztrátu neuronů, výsledky nepoukazují na klinickou účinnost u mírné až středně těžké formy AD. Z této studie tedy vyplývá otázka, zda se inhibice GSK-3 β v terapii Alzheimerovy choroby vůbec uplatní, proto se počítá s dalšími studiemi, které se budou zabývat touto problematikou (Lovestone et al., 2015).

2.1.8.9 Multi-target-directed ligands

Vzhledem k mnohočetné etiologii Alzheimerovy choroby se v posledních letech výzkum snažil nalézt takové struktury, které dokážou zasáhnout několik cílů současně. Momentálně se v klinické praxi využívá terapie MMT (multiple-medication therapy), což je v podstatě kombinace několika léčiv užívajících se na konkrétní onemocnění s odlišným mechanismem účinku (např. kombinace memantinu a inhibitorů AChE). Tento druh terapie se již osvědčil v terapii HIV, rakoviny či hypertenze, kde bylo dosaženo maximální účinnosti zásahem několika cílů současným synergickým působením s minimální toxicitou. Další terapeutickou možností u léčby chorob mnohočetné etiologie je MCM (single-pill drug combination), zde je do jedné lékové formy inkorporováno několik různých léčiv především pro zjednodušení užívání pacienty a zvýšení compliance. Poslední strategie vznikla na základě předpokladu, že by stačila pouze jedna sloučenina, která by byla schopna zasáhnout několik cílů zároveň. Jedná se o tzv. Multi-target-directed ligands (MTDLs). Tato terapie má mnoho výhod oproti MMT a MCM, především by se vyhnula administraci několika molekul s rozdílným mechanismem účinku, a tedy i odlišnou biologickou dostupností a farmakokinetikou. Jedním z nejběžněji používaných přístupů v této oblasti je modifikace molekulární struktury inhibitorů AChE tak, aby poskytla doplňující biologické vlastnosti vhodné pro léčbu AD. Použití těchto ligandů na několik cílových struktur současně

by tak mohlo představovat již dlouze očekávaný průlom v léčbě tohoto onemocnění (Cavalli et al., 2008).

2.1.8.10 Imunizace β -amyloidem

Mezi inovativní přístupy v léčbě AD se v současné době řadí stimulace clearance $A\beta$ prostřednictvím aplikace $A\beta$ antigenu (aktivní imunizace) nebo anti- $A\beta$ protilátek (pasivní imunizace). Mechanismus odstranění $A\beta$ z mozku protilátkami není zcela znám. Předpokládá se postupné narušení depositů $A\beta$, inhibice agregace a aktivace mikroglíí vyvolaná fagocytózou zprostředkovanou Fc-fragmentem (tj. konstantní doménou těžkého řetězce protilátek). Jako perspektivní protilátky se v I. a II. fázi klinických studií osvědčily bapineuzumab a solanezumab (Panza et al., 2012). Ve III. fázi klinických studií se ovšem nedospělo k pozitivním výsledkům, což bylo vysvětleno tím, že léčba byla u pacientů s pokročilým stádiem AD nedostačující, nebo $A\beta$ nebyl tím správným cílem pro efektivní léčbu. V souvislosti s tím se výzkum zaměřil na preklinické studie tau-vakcín, které by již brzy měly vstoupit do klinického hodnocení, a jež by mohly zefektivnit terapii AD v kombinaci s anti- $A\beta$ (Salloway et al., 2014).

2.2 Hematoencefalická bariéra

Hematoencefalická bariéra (HEB) je vysoce selektivní, polopropustná bariéra, která rozděluje cirkulující krev od extracelulární tekutiny (ECT) v centrální nervové soustavě (CNS). Tvoří rozhraní mezi centrální a periferní nervovou soustavou (PNS). Hlavní funkcí HEB je udržování homeostázy tím, že výrazně reguluje vstup látek z krve do ECT mozku, aby nedošlo k poškození neuronů či neurotoxicitě. Sekundární funkcí je regulovat živiny přicházející z krve, proto obsahuje mnoho transportérů pro glukózu, insulin, aminokyseliny či neuroaminové prekurzory. Je proto tvořena endoteliálními buňkami, které jsou spojeny v tight junctions (struktura těsných spojů) pomocí proteinů claudinu, okcludinu a caderinu. Díky této struktuře je výrazně znemožněn transport hydrofilních látek, dokonce i pohyb Na^+ a Cl^- iontů je skrze HEB velmi omezen. Povrch buněk nese záporný náboj, proto jsou látky se záporným nábojem silně odpuzovány. Endoteliální buňky jsou součástí neurovaskulárního systému, zahrnující pericity, astrocyty, mikroglie, neurony. Pericyty pomáhají budovat membránu HEB, astrocyty zprostředkovávají látkovou výměnu s krví či mozkomíšním mokem a zabraňují šíření vzruchu mimo synapse. Mikroglie jsou přirozenou součástí imunitního

systému, fyziologicky jsou neaktivní, ale při narušení homeostázy např. vlivem infekce se ihned aktivují a pomáhají vyrovnat rovnováhu.

HEB slouží též jako metabolická bariéra – je zde přítomno několik intracelulárních a extracelulárních enzymů mající především katabolickou funkci jako například peptidázy, nukleotidázy, monoaminoxidázy či cytochrom P-450 (Kuhnlina Sloan et al., 2012).

Na Obr. 2 jsou zobrazeny hlavní typy transportu látek přes HEB. Patří sem pasivní difúze, kdy lipofilní látky pronikají samovolně ve směru koncentračního gradientu skrz endoteliální buňky, paracelulární transport hydrofilních látek skrz póry mezi buňkami, a také transport zprostředkovaný přenašeči specifickými pro konkrétní molekuly.

Dochází zde však ke 2 hlavním aktivním procesům, které ovlivňují penetraci – influxní transport, který zahrnuje výše popsané, a efluxní transport (Crivori et al., 1999). Ten byl objeven při nejasnostech týkajících se významně nízké penetrace doxorubicinu a vinkristinu přes HEB. Z jejich vysoce lipofilní struktury by se dalo usuzovat, že HEB prostoupí snadno, ovšem nebylo tomu tak. Později bylo zjištěno, že jsou z mozku aktivně eliminovány efluxními transportéry. Slouží v podstatě jako ochranná bariéra, která odstraňuje léčiva z mozku a cerebrospinální tekutiny a transportuje je zpět do systémové cirkulace.

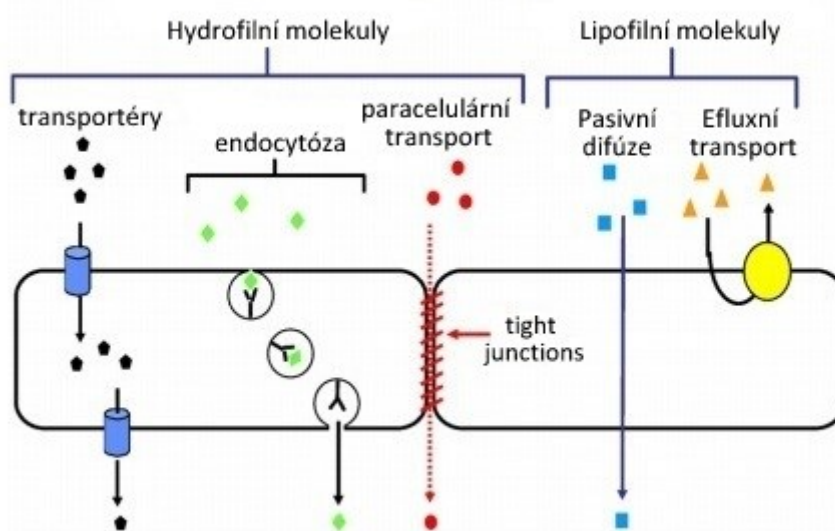
Nejnámějším efluxním transportérem je P-glykoprotein, nacházející se nejen v endoteliálních buňkách mozku, ale také v absorpčních (tenké střevo) a eliminačních orgánech (játra, ledviny), kde plní ochrannou/exkreční funkci. Dělí se na 2 typy: MDR1 a MDR2 (Multidrug-resistance protein). Druhé jmenované vykazují vysokou substrátovou specifitu pro vinka-alkaloidy a antracykliny, čímž způsobí mnohočetnou lékovou rezistenci na všechny nádorové buňky (Kusuhara and Sugiyama, 2001).

P-glykoprotein se řadí do skupiny transportérů vázajících ATP (tzv. ATP-binding cassette; ABC) společně s dalšími efluxními transportéry jako např. breast cancer resistance protein (BRCP), pocházející z doxorubicin-rezistentní buněčné linie karcinomu prsu MCF7. Tento transportér vykazuje vysokou substrátovou specifitu na mnohé molekuly zejména s pozitivním i negativním nábojem, organické anionty a síranové konjugáty. Nachází se v kmenových a nádorových buňkách, v játrech, střevech, ledvinách i mozku, ve kterém se předpokládá ochranná funkce před xenobiotiky (Staud and Pavěk, 2005).

Do ABC skupiny se řadí také tzv. multidrug-resistance associated protein-1 (MRP -1), což je primární aktivní transportér konjugovaných metabolitů glutationu a glukuronidu. Způsobuje stejně jako P-glykoprotein mnohočetnou lékovou rezistenci k protirakovinným

léčivům jako jsou doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, vinkristin, vinblastin a etoposid. Tento transportér se nachází především na bazální membráně varlat Sertolliho buněk a basolaterální membráně epiteliálních buněk plic. V menší míře se však také nachází v mozku v choroidním plexu. Aby se tomuto způsobu eliminace léčiv předešlo, zaměřil se výzkum na nalezení inhibitorů efluxních transportérů či na modifikaci struktury léčiv, díky čemuž transportér molekulu nerozezná a neeliminuje léčiva zpět do cirkulace (Kusuhara and Sugiyama, 2001).

Vstup do mozku je složitý jev, který závisí na mnoha faktorech. Permeaci látky skrz HEB ovlivňuje hned několik parametrů jako stupeň lipofility, ionizační profil sloučenin, velikost dané molekuly, počet donorových a akceptorových vodíkových vazeb a v neposlední řadě prostorová konformace sloučenin, vzhledem k anizotropnímu charakteru všech biologických membrán (Crivori et al., 1999).



Obr. 2: Způsoby transportu látek přes HEB. Zleva je zobrazen přenos typický pro hydrofilní molekuly, tedy přenašečem zprostředkovaný transport, při kterém hydrofilní látky procházejí pouze pomocí svých v specifických transportérů přítomných v cirkulaci. Druhý zleva znázorňuje endocytózu, tedy vchlipování molekuly do buňky za vzniku měchýřku a jeho následného rozpadu a uvolnění molekuly na druhé straně buňky, které se ovšem využívá zejména v řízené distribuci léčiv, ne pro prostup látek skrz HEB. Posledním typem transportu hydrofilních molekul je paracelulární transport zprostředkovaný skrz strukturu tight junctions. Lipofilní látky pronikají nejčastěji pasivní difúzí, tedy samovolně dle svého koncentračního gradientu. Posledním způsobem přenosu látek je efluxní transport, který na rozdíl od všech předešlých zprostředkovává transport látek zpět ven z buňky. Modifikováno dle: (Gabathuler, 2010).

2.3 In vivo metody pro studium prostupu látek přes hematoencefalickou bariéru

V rámci současného výzkumu léčiv bylo vyvinuto několik různých metod pro zkoumání transportu látek skrz HEB (Kuhnline Sloan et al., 2012). Experimenty prováděné v *in vivo* podmínkách nabízejí nejspolehlivější reference pro testování a validaci dalších metod. Existuje několik invazivních a neinvazivních metod dostupných k měření biologické dostupnosti látek v mozku (Mensch et al., 2009). Všechny tyto metody vyžadují k monitorování prostupu přes HEB citlivé a selektivní analytické metody (Kuhnline Sloan et al., 2012).

2.3.1 Parametr kvantifikace log BB

Rovnovážná distribuce mezi krví a mozkiem je definována jako logaritmus poměru celkové rovnovážné koncentrace (steady-state) sloučeniny v mozku a její koncentrace v krvi. Log BB závisí na pasivní difúzi, transportérech v HEB, metabolismu a rozdílech ve vazebné afinitě mezi plazmatickými proteiny a mozkovou tkání. Pro výpočet se využívají poměry mozek/plazma stanovené v několika časových bodech, pokud by se měřila hodnota log BB pouze v jednom časovém bodě, výsledná hodnota by závisela pouze na koncentraci v konkrétním čase. Poměr je poté vypočten z plochy pod křivkou (AUC), grafu znázorňující koncentraci dané látky v čase. Obecně, sloučeniny s poměrem > 1 pronikají skrz HEB snadno, látky s $\log BB > 0,3-0,5$ mají omezený přístup do CNS a látky s hodnotou $\log BB < 0,1$ nejsou schopny přes HEB pronikat, případně jsou z něj eliminovány nebo po cestě do mozku zmetabolizovány. Měření ovšem často vyžadují velký počet zvířat pro určitý časový úsek, čímž je tato metoda finančně, materiálně i eticky, velmi náročná (Mensch et al., 2009).

2.3.2 Metody provedení: perfúze mozku, intravenózní injekce, kvantitativní autoradiografie

Pro přesné sledování permeace látek skrz HEB byly vyvinuty metody založené na **perfuzi mozku**. Zde je sloučenina rozpuštěna v umělé krvi či plazmě a podána infúzí do karotidy, která vede přímo do mozku (Mensch et al., 2009). V předem stanoveném čase je perfúze zastavena, zvíře je dekapitováno a stanovuje se množství látky proniknuté do mozku za určitý čas. Výsledek je vždy porovnáván se standardem, který skrz HEB snadno proniká. Tento přístup je výhodný v tom, že obchází first-pass metabolismus. Do perfuzátu mohou být navíc přidány inhibitory enzymů nebo efluxní transportéry, díky čemuž lze objasnit roli

v transportu a metabolismu použitých sloučenin. Na druhou stranu nespecifická adsorpce léčiv na mozkovou tkáň může vést k chybným závěrům týkajících se aktivity látek, protože jen volná frakce léčiva je fyziologicky aktivní (Kuhnline Sloan et al., 2012). Další obdobnou metodou je aplikace **intravenózní injekce**. Zvířeti je intravenózně podána konkrétní sloučenina a poté se zaznamenává její dosažená koncentrace v mozku, plazmě a mozkomíšním moku v určitých časových intervalech. Fyziologické a metabolické pochody tak zůstávají neovlivněny, čímž je dosaženo nej přesnějšího posouzení, jaké procento z podané dávky se dostane skutečně do mozku (Kuhnline Sloan et al., 2012). **Kvantitativní autoradiografie (QAR)** zahrnuje aplikaci radioaktivní látky (nejčastěji látka značena ^{14}C) laboratornímu zvířeti. Vzorky krve jsou periodicky odebírány a radioaktivita měřena ke stanovení časového průběhu koncentrace. Zvířecí mozek je poté zamražen, rozdělen na 20 μm tenké části a umístěn dovnitř kazety s rentgenovým zářením, kde je prozkoumán. Distribuce a kvantitativní stanovení radioaktivity se stanoví metodou analýzy obrazu. K výpočtu parametrů PS (permeabilita x plocha povrchu látky) se musí provádět samostatné měření regionálního průtoku krve. Mezi přednosti této metody patří zejména vysoké prostorové rozlišení. Nedostatkem je časová náročnost, stejně jako u výše zmíněných metod nutnost použití velkého množství zvířat, a také to, že autoradiografie nedokáže rozeznat rozdíl mezi původní sloučeninou a metabolitem či rozlišit sloučeniny vázané či nevázané na proteiny (Mensch et al., 2009).

2.3.3 Mikrodialýza

Mikrodialýza vzorků byla vyvinuta v roce 1970 jako minimálně invazivní metoda pro monitorování neurotransmiterů v mozku (Kuhnline Sloan et al., 2012). Sonda, skládající se z krátkých vláken semipermeabilní dialyzační membrány, je implantována do tkáně v mozku a prolévána perfuzátem. Jedná se o fyziologický roztok, jenž má složení srovnatelné s extracelulární tekutinou z důvodu předcházení nežádoucích změn ve složení extracelulární tekutiny, která obklopuje sondu. Sloučeniny, které prostupují do mozku, difundují skrz membránu do perfuzátu prostřednictvím svého koncentračního gradientu a jsou kontinuálně odebírané do analyzátoru jako dialyzát. Koncentrace látek přítomných v dialyzátu je poté změřena příslušnou analytickou metodou (Mensch et al., 2009). Předností je výrazné snížení počtu usmrcených zvířat potřebných k získání relevantních dat, jelikož dlouhodobé vzorkování může být provedeno na jednom, a to živém zvířeti. Vzorky získané mikrodialýzou neobsahují díky dialyzační membráně bílkoviny, sloučeniny nejsou nijak vázány, což

znamená, že touto metodou je měřena pouze aktivní, volná forma léčiva. Metoda má však i stinné stránky. Při dlouhodobé implantaci sondy do mozku může nastat v rámci imunitní odpovědi obranná reakce, a tedy poškození tkáně vyúsťující ve fibrózu. Dále se též hovoří o možném narušení integrity HEB při implantaci sond (Kuhnline Sloan et al., 2012).

2.3.4 Tomografické metody

Nedávno byly také použity moderní metody PET (photon emission tomography) a SPECT (single-photon emission-computed tomography) ke studiu kinetiky a prokrvení v mozku, integrity HEB a efluxních mechanismů. Malé množství sloučeniny značené radionuklidem je intravenózně aplikováno a distribuováno do různých tkání v organismu. Poté je změřeno emitované γ -záření jako funkce hloubky průniku. Následně je použit počítačový software k vytvoření 3D rozlišení znázorňujícího distribuci látky v mozku a dalších tkáních (Kuhnline Sloan et al., 2012). PET je v současnosti nejpokročilejší technologie, sledující biochemické pochody jako metabolismus glukózy, krevní cirkulaci, distribuci receptorů, aktivitu P-glykoproteinu, enzymy a neurotransmitery především proto, že se jedná o rychlou, reprodukovatelnou a vysoce citlivou metodu (Mensch et al., 2009). Poskytuje o něco vyšší rozlišení než SPECT, ovšem obě tyto technologie jsou neinvazivní a mohou být použity jak na zvířatech, tak na lidech. Mezi nedostatky těchto metod patří především vysoká nákladnost přístrojového vybavení a nutnost syntézy radioaktivní sloučenin. Některé z nich mají navíc poločas rozpadu kolem 20 min, a proto musí být syntetizovány těsně před aplikací (Kuhnline Sloan et al., 2012).

2.3.5 Magnetická rezonance

Magnetická rezonance patří též mezi neinvazivní, citlivé, kvantitativní techniky pro detekci poškození HEB, což se uplatňuje v řadě onemocnění jako roztroušená skleróza, cévní mozková příhoda či nádory mozku. Metoda zahrnuje vyčíslení distribuce gadolinium-diethylentriaminpentaoctové kyseliny (Gd-DTPA) jako kontrastní látky v mozkové tkáni po intravenózní bolusové aplikaci. Jedná se o velmi nákladnou metodu, proto je její použití pro běžné screeningové stanovení ve výzkumu léčiv omezeno (Mensch et al., 2009).

2.4 *In vitro* metody prostupu skrz HEB

Vědci také vyvinuli buněčné modely pro *in vitro* metody, u kterých je předpokladem využití predikce transportu a metabolismu látek přes HEB bez účasti systémových pochodů

organismu. Stejně jako u *in vivo* metod je vyžadováno použití vysoce citlivých a selektivních metod, jež jsou popsány níže.

2.4.1 Buněčné kultury

Použití buněčných kultur pro studium penetrace molekul přes HEB se jeví jako velmi výhodné především z pohledu jejich pronikání jak pasivními, tak aktivními mechanismy. Vědci předpokládali, že nejvýhodnějším buněčným modelem pro studium jsou endoteliální buňky izolované z mozkových kapilár. Jako první buněčný model byly proto využity kultury izolované z šedé kůry mozkové z mozku skotu. Efluxní transportéry stejně jako specifické vychytávání sloučenin jsou tímto modelem zohledněny a jsou také podrobně charakterizovány tak, aby podaly relevantní informace k průzkumu Pe HEB. Jedny z nejběžnějších primárních buněčných modelů jsou endoteliální buňky z mozku skotu a prasete, známé jako BBMEC's a PBMEC's, které se využívají zejména ke studiu transportu látek přes HEB. Dalším typem buněk jsou tzv. „immortalized cell lines“, které však nejsou použitelné k předpovědi transportu z důvodu nedostatečně pevné struktury těsných spojů, ale nacházejí uplatnění ve zkoumání endoteliálního vychytávání a absorpce látek (Kuhnline Sloan et al., 2012). Ovšem samotný model těchto i BBMEC's a PBMEC's buněk je mj. velice nákladný a pracově náročný, a proto nejsou považovány za vhodný model pro rutinní průmyslové použití. Výzkum se proto zaměřil na epiteliální typ buněčných linií. Vysoce srovnatelné korelace *in vitro-in vivo* penetrace bylo dosaženo s epiteliálními buněčnými kulturami Caco-2, což jsou lidské buňky izolované z adenomu tlustého střeva (Hellinger et al., 2012). Ty prokázaly významnou korelaci s *in vivo* intestinální absorpcí u člověka a staly se tak jedním z modelů pro predikci intestinální absorpce. Byly též použity ke stanovení Pe HEB, ovšem ve srovnání s endoteliálními buňkami hovězího mozku nejevily téměř žádnou účinnost, proto je jejich využití v predikci transportu přes HEB bezvýznamné (Mensch et al., 2009). Zato poměrně spolehlivým ukazatelem penetrace se staly geneticky modifikované kultury MDCK buněčné linie (epiteliální ledvinné buňky psů transdukované s lidským genem MDR1), které na rozdíl od Caco-2 prokázaly schopnost správně identifikovat penetraci látek do CNS díky schopnosti exprimovat P-glykoprotein, který Caco-2 nedokázaly identifikovat. Toto poznání bylo prokázáno v jedné studii při penetraci antimalarik skrz HEB, kdy s použitím Caco-2 buněk bylo dosaženo nezvykle vysoké permeace léčiv, což bylo pravděpodobně výsledkem absence P-glykoproteinu. Nadměrná exprese P-glykoproteinu MDCK buňkami nabízí jejich využití například při stanovení, zda sloučenina vykazuje interakce s P-glykoproteinem.

Faktem je, že aplikace všech jmenovaných buněčných kultur jako vysoce propustného materiálu je limitována komplikovanou přípravou membrány a vysokou cenou zdrojů (Kuhnline Sloan et al., 2012).

2.4.2 Zkouška paralelního umělého membránového pronikání (PAMPA)

PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeation Assay) je nebuněčná metoda založená na paralelním pronikání látek uměle vytvořenou membránou a poskytující predikci Pe léčiv po perorálním podání nebo predikci prostupu přes HEB pasivní difúzí. Princip spočívá v měření schopnosti průniku sloučeniny z donorové do akceptorové části mikrotitrační desky skrz umělou vrstvu, napuštěnou fosfolipidem, izolovaným z mozku prasete (PBL, Polar Brain Lipid). Toto uspořádání se někdy označuje jako „sendvič“. Sloučeniny jsou nejprve rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) a poté naředěny ve fosfátovém pufru (PBS) na konkrétní koncentraci. V případě dobré rozpustnosti mohou být rozpuštěny přímo v hydrofilním PBS. Testované látky jsou napipetovány do donorových jamek destičky, na jejichž dně je dopředu nanesen PBL rozpuštěný v roztoku dodekanu na hydrofobní membránu, který slouží jako umělá membrána simulující HEB. Do akceptorových jamek je napipetován fosfátový pufr. Akceptorová část se překlopí donorovou a roztoky se nechají inkubovat při pokojové teplotě. V určitých časových intervalech pak dochází k odebírání jednotlivých vzorků a měření absorbance pomocí spektrofotometru či stanovením na LC-MS systému, prostřednictvím čehož se získají potřebné údaje k posouzení Pe daných sloučenin přes membránu. Mezi přednosti této metody patří relativně vysoká rychlost měření, reprodukovatelnost, finanční nenákladnost a v neposlední řadě možnost jejího využití též při studiu průniku bariérami gastrointestinálního traktu či kůže. Na druhou stranu, PAMPA zřejmě nikdy nebude moci být přesnou simulací endoteliální buněčné membrány mozku z toho důvodu, že bere v potaz pouze pasivní difúzi léčiv, ale již ne facilitované transportní mechanismy. Veškeré zákonitosti spojené se stanovením Pe metodou PAMPA se odvíjejí od fyzikálně-chemických vlastností daných léčiv. Účelem při vývoji této metody bylo přijít s lipidovou formulací, která je praktická, reprodukovatelná a poskytuje spolehlivou korelaci k sofistikovanějším metodám *in vitro* predikce (Di et al., 2003).

2.5 Analytické metody k *in vitro*/*in vivo* studiu

Poté co je vybrán *in vitro* model HEB, následným úkolem je zvolit technologii s dostatečnou citlivostí k monitorování transportu daných sloučenin. Při volbě analytické metody rozhodují zejména parametry jako předpokládaná koncentrace léčiva v donorové i akceptorové části transportního systému, absorpance v UV/VIS spektru, možnost označit (fluorescenčně či radioaktivně) dané sloučeniny pro následnou detekci, objem vzorku, případně kompatibilita buněčného materiálu s požadovanou technologií. Níže uvedené metody jsou použitelné též pro studium prostupu *in vivo*.

2.5.1 Ukazatele permeability

Jakmile je dokončena studie *in vitro* s použitím BBMEC's, je provedena další analýza ke kvantifikaci transportu či koeficientu zdánlivé P_e sloučenin. Je nezbytné použít správné kontrolní vzorky, aby se vhodně posoudila integrita buněčné vrstvy a byly tak ověřeny podmínky transportu léčiv. Na konci experimentu jsou proto na apikální stranu difúzní komory pro zhodnocení integrity tight junctions přidány nízkomolekulární látky, které membránou neprostupují. K této metodě se nejčastěji využívá radioaktivně či fluorescenčně značená sacharóza. Při těchto zkouškách je velmi důležité zajistit podmínky vhodné pro životaschopnost buněk, ty zahrnují fyziologické pH (7,4), glukózu jako zdroj energie, isotonické prostředí a integritu těsných spojů.

2.5.2 Scintilační měření

Jednou z nejjednodušších metod stanovení transportu sloučenin přes HEB je použití radioaktivně značených látek a scintilace. Tato metoda je využívána především ke stanovení, zda saturabilní, nosičem zprostředkované transporty jsou zodpovědné za permeaci. Látka je přidána do difúzní komory a měří se její permeace. Poté je zhodnocen účinek radioaktivně neoznačené látky na permeaci látky radioaktivně značené. Zhoršení permeace značené sloučeniny ukazuje, že tyto 2 látky kompetují o stejný transportní systém. Tato metoda je však velice nákladná z důvodu nutnosti syntézy radioaktivně značených sloučenin a vyžaduje speciální povolení pro zacházení s radioaktivním materiálem.

2.5.3 Kapilární elektroforéza

Metoda kapilární elektroforézy je v kombinaci s fluorescenční detekcí hojně využívána k analýze transportu peptidů. Obrovskou předností je spotřeba minoritního

množství vzorku k měření. Nedostatkem je ovšem nutná derivatizace vzorku před samotnou analýzou. Mnoho metod používajících radioaktivní či fluorescenční značení vyžadují reakci s aminovou skupinou jako je například N-konec peptidů či lysinové zbytky. Proto peptidy s modifikovanými N-konci nebo s postrádajícím lysinovým zbytkem nejsou detekovány. I přesto je tato metoda považována za velmi perspektivní a vysoce citlivou techniku.

2.5.4 Kapalinová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (LC-MS)

LC-MS je spojení 2 vysoce citlivých, selektivních a univerzálních metod ke stanovení kvantifikace sloučenin. HPLC (high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je technika kvantitativního a kvalitativního stanovení látek v rámci separace mobilní a stacionární fáze na základě fyzikálně chemických jevů ve vybraném systému. K detekci látek je zde použita metoda hmotnostní spektrometrie (MS), která slouží k určení molekulové hmotnosti analytu, identifikaci sloučenin, objasnění jejich struktury či kvantifikaci. Princip zahrnuje ionizaci molekul analytu elektrosprejem v plynné fázi a následné rozdělení v čase nebo v prostoru dle jejich hmotnosti a náboje (m/z). Podrobnější postup je popsán v pracovním postupu experimentální části 4.2.4. Matrice s vysokým obsahem solí, které jsou nezbytné pro funkci buněk však mohou představovat několik analytických překážek v souvislosti s použitím LC-MS metody. Roztoky s vysokým podílem solí jsou totiž inkompatibilní s ionizací elektrosprejem, jelikož může dojít ke značnému poškození sondy ve spektrometru. Jednou z možností, jak se tomuto poškození vyhnout, je naředit vzorek mobilní fází ke snížení koncentrace solí. Popřípadě lze provést před analýzou extrakci kapalina-kapalina či kapalina-pevná látka (Kuhnline Sloan et al., 2012).

2.6 M2 látky v PAMPA eseji

Hlavním úkolem této diplomové práce bylo predikovat prostup takrinových derivátů benzylesteru kyseliny chinolonkarboxylové (BQCA; Benzyl Quinolone Carboxylic Acid, viz Obr. 4) přes PBL, které by mohly znamenat pokrok v léčbě Alzheimerovy choroby. Jedná se o celkem 9 sloučenin, udávající pod zkratkou M2: M2-7.1, M2-9.1, M2-10.1, M2-11.2, M2-12.1, M2-15.1, M2-21.1, M2-22.1 a M2-30.1. Jejich struktury jsou popsány níže v experimentální části. Všechny testované látky jsou relativně vysoce lipofilní, proto velmi důležitým krokem v rámci zkoušky PAMPA bylo zajištění jejich dostatečného rozpuštění.

2.7 Pluronic F-127

Použití solvens DMSO/PBS k solubilizaci testovaných látek se ukázalo jako nedostačující. Následovalo tedy přidání Pluronicu F-127 do PBS za vzniku 1% roztoku pro zlepšení rozpustnosti těchto sloučenin. F-127 je amfifilní blokový kopolymer složený z centrálního hydrofobního jádra polypropylenoxidu, lemovaného 2 hydrofilními řetězci polyetylenoxidu. Jeho hlavní předností je nízká toxicita a tvorba stabilních koloidních micel, které jsou složeny z hydrofilního obalu a hydrofobního jádra. Rozpustnost testovaných látek je umožněna zachycením molekul sloučenin uvnitř tohoto jádra. Micely jsou vysoce stabilní, k rozpadu dochází tedy velmi pomalu a postupně, dokonce i při poklesu koncentrace pod kritickou micelární koncentraci (CMC), tedy koncentraci, při níž se v roztoku polymeru začnou tvořit micely, byla zvýšená solubilizace pozorována. Na rozdíl od povrchově aktivních látek mají velké jádro, což též přispívá ke snadnějšímu rozpuštění objemnějších látek.

3. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo predikovat vstup derivátů benzylesteru kyseliny chinolonkarboxylové (BQCA) přes HEB. Konkrétně jsme se zaměřili na:

- Zavedení screeningové metody PAMPA pro studium predikce vstupu molekul přes HEB
- Korelace výsledků s fyzikálně-chemickými vlastnostmi
- Využití solubilizéru Pluronic F-127 pro usnadnění solubilizace testovaných látek
- Porovnání P_e testovaných látek s P_e standardních látek se známou vstupností
- Studium závislosti rozpustnosti látek na jejich hodnotě $\log P$ či $\log D$ a význam těchto ukazatelů pro predikci pomocí této screeningové metody.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 *Použitý materiál*

4.1.1 **Přístroje a pomůcky:**

Centrifuga Universal 320 R (Hettich), Schoeller

Multidetekční reader Synergy HT, BioTek

Analytické váhy CPA225, Sartorius Stedim Biotech

Ultrazvuková lázeň Bandelin sonorex

Vodní lázeň, PolyScience

Automatické pipety Research plus, Eppendorf

Vortex Mixer Wizard, Velp Scientifica

UV permeabilní titrační desky Merck Millipore, MAIPN 4550

Eppendorf Tubes 2.0 ml, Eppendorf AG

Eppendorf Tips 50 – 1000 µl, Eppendorf AG

Centrifuge Tubes 50 ml, TPP

Dionex UltiMate 3000 analytical LC-MS system spojen s Q Exactive Plus hybrid quadrupole-orbitrap spektrometrem - ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany

4.1.2 **Chemikálie:**

Dimethyl sulfoxide for molecular biology (DMSO), Sigma-Aldrich

Dodecane, Sigma-Aldrich

PBL: Polar Brain Lipid Extract, Avanti Polar Lipids

Pluronic F-127, SigmaAldrich

Fosfátový pufr Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline pH = 7.4(PBS), PAA Laboratories

Acetonitril - Sigma Aldrich, product no.: 34967

Kyselina mravenčí - Sigma Aldrich, product no.: 34860

4.1.3 Standardní látky

Jedná se o známá léčiva o různé lipofilitě, jejichž prostup do mozku je v literatuře popsán pomocí PAMPA eseje a jejichž propustnost přes HEB je známá z klinického používání. Tato léčiva se proto tedy proměřila v 1% roztoku F-127 v PBS a společně se pro srovnání provedlo i měření v PBS.

Donepezil – Sigma-Aldrich

Testosteron – Riedel-de Haen®, T. Vetranal

Hydrokortizon – Sigma-Aldrich

Piroxikam – Sigma-Aldrich

Theofylin – Sigma-Aldrich

Atenolol – Sigma-Aldrich

Chlorpromazin hydrochlorid – Riedel-de Haen®, T. Vetranal

Loperamid – Riedel-de Haen®, T. Vetranal

Desipramin – Sigma-Aldrich

Estradiol – Sigma-Aldrich

Progesteron – Sigma-Aldrich

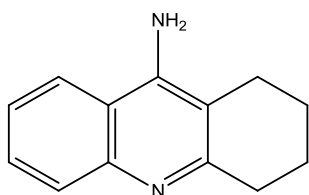
Imipramin – Sigma-Aldrich

7-methoxytakrin – látka připravena na katedře Toxikologie a vojenské farmacie v Hradci Králové, Fakulty vojenského zdravotnictví univerzity obrany

4.1.4 Nové testované látky

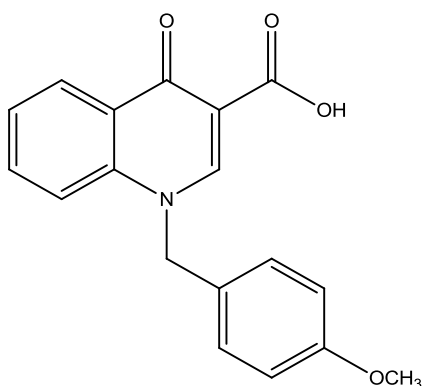
Testované látky s označením M2 jsou látky potenciálně účinné proti progresi Alzheimerovy choroby. Jedná se o takrinové deriváty, které mají na aminovou skupinu napojený postranní řetězec s různou délkou uhlíkových spojovacích řetězců, na který je napojen přes amidovou skupinu derivát benzylesteru kyseliny chinolonkarboxylové (BQCA) (viz Obr. 8, Obr. 12 a Obr. 13). U některých látek se v molekule nachází na benzenovém jádře další postranní řetězec s chlorem (viz Obr. 9, Obr. 10 a Obr. 11) či ethoxy skupinou (viz Obr. 5, Obr. 6 a Obr. 7). Takrinová část slouží jako inhibitor acetylcholinesterázy (AChE). U farmakoforu odvozeného od BQCA se předpokládá alosterická modulace M₁

muskarinových receptorů. Z této série bylo vybráno 9 látek, u kterých lze predikovat duální mechanismus účinku, tedy inhibice AChE a alosterická stimulace muskarinových receptorů M₁.



Obr. 3: Takrin

Systematický (IUPAC) název: 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride



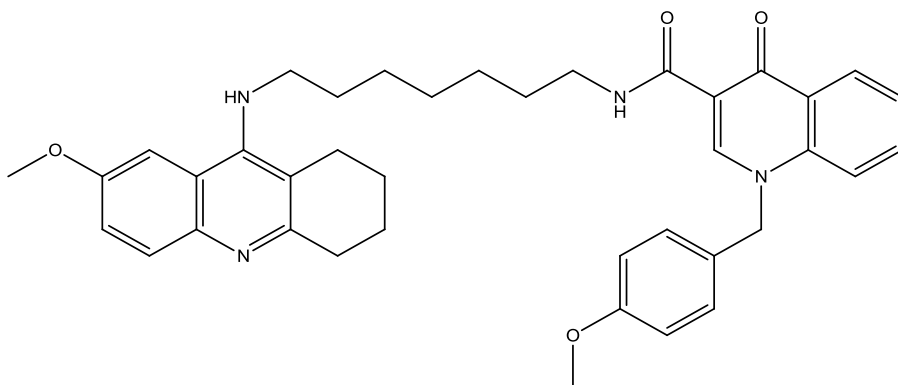
Obr. 4: BQCA

Systematický (IUPAC) název: 1,4-dihydro-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acid

M2 7.1

Systematický (IUPAC) název:

N--1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide

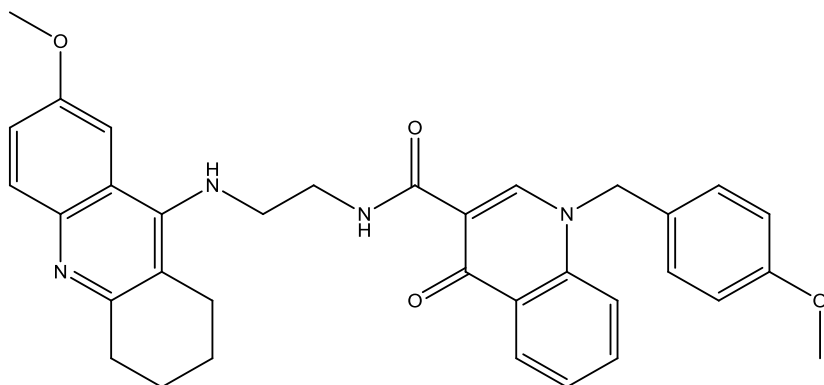


Obr. 5: Testovaná látka M2 7.1

M2 9.1

Systematický (IUPAC) název:

N--1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide

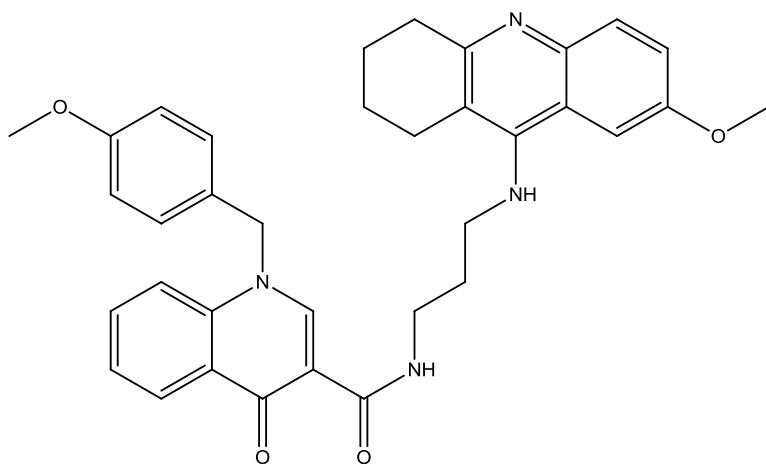


Obr. 6: Testovaná látka M2 9.1

M2 10.1

Systematický (IUPAC) název:

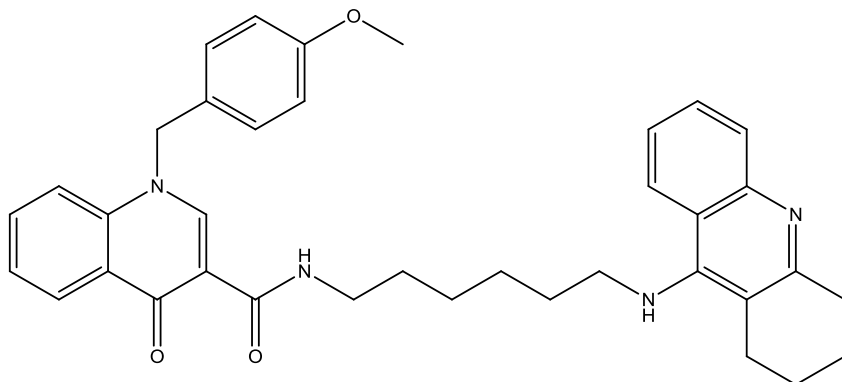
N--1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide



Obr. 7: Testovaná látka M2 10.1

M2 11.2

1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-N--1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide

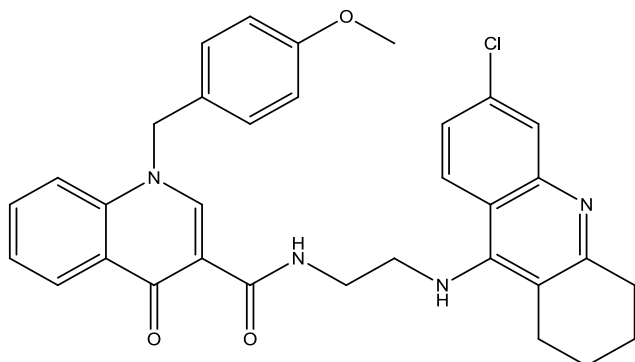


Obr. 8: Testovaná látka M2 11.2

M2 12.1

Systematický (IUPAC) název:

N-(1-(4-chlorophenyl)-1,4-dihydroacridin-9-yl)amino]ethyl)-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide

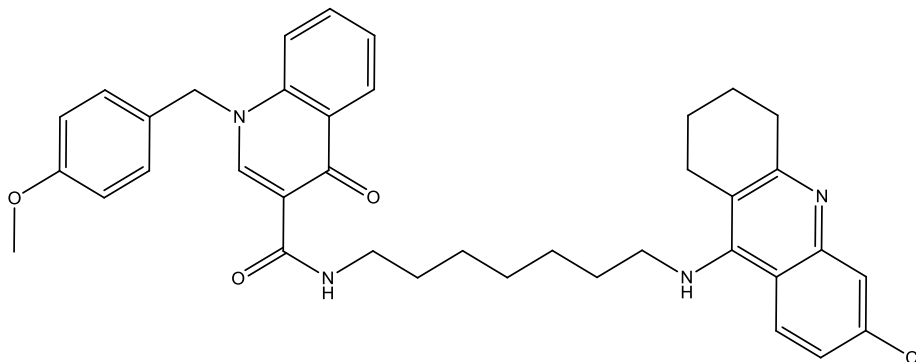


Obr. 9: Testovaná látka M2 12.1

M2 15.1

Systematický (IUPAC) název:

N-(7-[(6-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino]heptyl)-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide

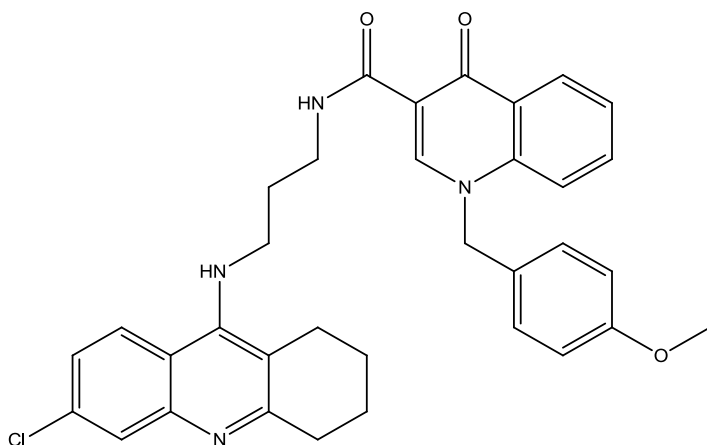


Obr. 10: Testovaná látka M2 15.1

M2 21.1

Systematický (IUPAC) název:

N-(3-[(6-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino]propyl)-1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide

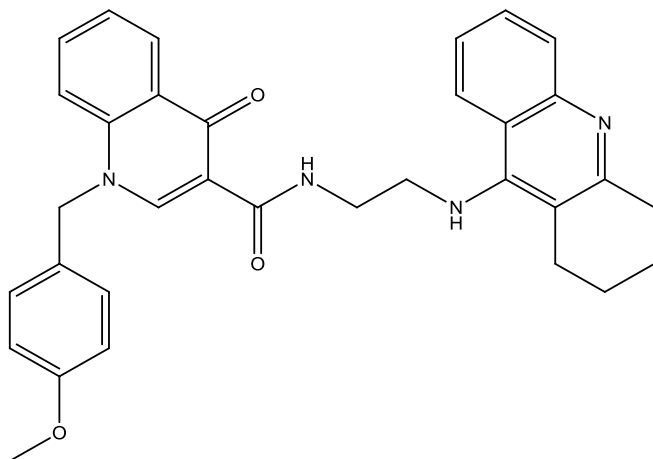


Obr. 11: Testovaná látka M2 21.1

M2 22.1

Systematický (IUPAC) název:

1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-N-(2-[(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino]ethyl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide

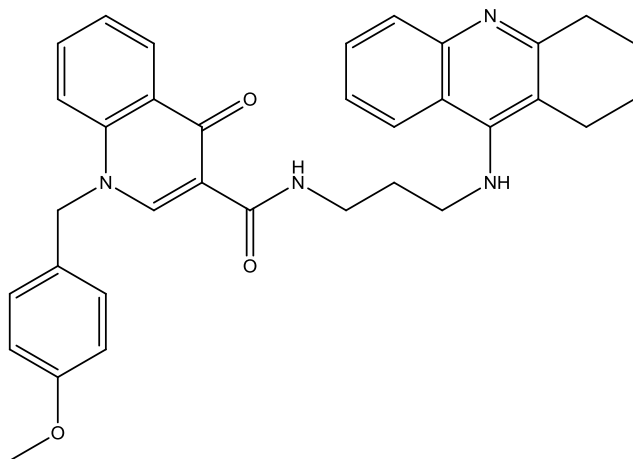


Obr. 12: Testovaná látka M2 22.1

M2 30.1

Systematický (IUPAC) název:

1-[(4-methoxyphenyl)methyl]-4-oxo-N-(3-[(1,2,3,4-tetrahydroacridin-9-yl)amino]propyl)-1,4-dihydroquinoline-3-carboxamide



Obr. 13: Testovaná látka M2 30.1

4.2 Pracovní postup

4.2.1 Protokol zkoušky PAMPA

1. Navážíme látku v množství zjištěném výpočtem pomocí molekulové hmotnosti látky, požadované koncentrace a požadovaného objemu zásobního roztoku.
2. Navážku rozpustíme ve 150 μl DMSO. Dostatečně hydrofilní látky se rozpustí přímo ve fosfátovém pufru (PBS) na požadovanou koncentraci a objem.
3. Do falkonky o objemu 15 ml napipetujeme 11 ml PBS nebo roztoku F-127 v PBS a přidáme část zásobního roztoku určeného výpočtem k dosažení požadované koncentrace (obvyčejně 100 μM = primární roztok).
4. Promícháme, případně vložíme na několik min. do ultrazvuku či vodní lázně vyhřáté na 37 $^{\circ}\text{C}$.
5. Naředíme si kalibrační škálu. Pokud je max. koncentrace 100 μM , zvolí se hodnoty např. 20, 40, 60, 80 apod. Pomocí spektrofotometru změříme absorpční spektrum látky v roztoku v oblasti 200-700 nm.
6. Odečteme vlnovou délku absorpčního maxima a absorbanci při maximální koncentraci.
7. Proměříme při absorpčním maximu absorbanci setu pro kalibrační křivku.
8. Primární roztok necháme min. 12hod stát.
9. Následující den roztok promícháme a zkontrolujeme, zda se látka z roztoku nevysrážela. Pokud ano, v případě PBS zcentrifugujeme (teplota na 25 $^{\circ}\text{C}$, rychlost otáček 5000ot/min a doba centrifugace 5 min). Cílem této manipulace je odebrat nasycený roztok bez nerozpuštěných krystalů. Při rozpouštění látek za pomoci F-127 není toto možné, protože dochází k rozkladu solubilizéru.
10. Inkubujeme za využití „sendvičového“ uskupení 2 mikrotitračních destiček (viz. Obr. 14) skládající se z vrchní donorové části s hydrofilní membránou na dně a spodní akceptorové části. Na membránu v každé jamce napipetujeme 4 μl roztoku PBL (Polar Brain Lipid) v dodekanu o $c = 20\text{mg/ml}$. Do akceptorové části napipetujeme 300 μl PBS. Do donorové části se přidá 300 μl primárního roztoku látky v daném rozpouštědle, pro každý časový bod (4 časové body) do 4 jamek (kvadruplikát). Pokud byla použita centrifuga k odstředění nerozpuštěných částí, pipetujeme opatrně ze střední části falkonky tak, aby se předešlo nasátí krystalů látky.



Obr. 14: „Sendvičové“ uskupení mikrotitračních desek. Spodní akceptorová část obsahuje pufr, v našem případě PBS či F-127. V prostřední donorové části jsou napipetovány vzorky standardů či testovaných M2 látek. Modifikováno dle: (Oxendine et al., 2006)

11. Vytvoříme také kontrolní destičku: do 3 jamek prvního sloupce napipetujeme po 250 μ l PBS, do 2. a 3. sloupce napipetujeme stejným způsobem roztoky testované látky. Jamky s pufrem vždy proměříme při stejné vlnové délce absorpčního maxima jako u testované látky. Takto zachytíme změny absorbance během inkubace pomocí spektrofotometru.
12. Titrační desku s látkami inkubujeme 3 hod. ve tmě za laboratorní teploty.
13. Po 3 hod. odebereme po 250 μ l z donorové i akceptorové části, napipetujeme na novou titrační destičku a změříme absorbanci ve spektrofotometru.
14. Každou další hodinu se postup opakuje. (celkem 4 časové body).
15. Koncentrace roztoků je poté vypočítána dle zjištěné absorbance a kalibrační přímky.
16. Během celého pokusu (cca 24 hod, 4 časové body) se sleduje změna v absorbanci primárního roztoku (100 μ M), za účelem monitorování srážení látky v rozpouštědle, a tedy změn její koncentrace v rozpouštědle.

4.2.2 Postup měření na spektrofotometru:

1. Spustíme Multidetekční reader Synergy HT, BioTek a poté počítač s nainstalovaným programem Synergy HT.
2. Do detektoru vložíme titrační desku a uzavřeme.
3. Nejprve potřebujeme zjistit vlnovou délku absorpčního maxima, která se proměří ze vzorku o maximálně koncentrovaném roztoku. Zvolíme tedy v tabulce pole s umístěným vzorkem a proměříme absorpční maximum.
4. Odečteme příslušnou vlnovou délku – ta nám slouží jako výchozí hodnota, při které se následně proměří ostatní vzorky kalibrační řady včetně pufru. Vždy proměříme triplikát každého vzorku.
5. Následující den napipetujeme kvadruplikát vzorku látky 4x na titrační desku a necháme 3 hod. inkubovat ve tmě. Po uplynulém čase odebereme první kvadruplikát vzorku, napipetujeme na jinou titrační desku a proměříme absorbanci v tomto čase. Měření provádíme vždy ve 4 časových intervalech, a to následovně: po prvním měření desku opět inkubujeme a po 1 hod. provedeme totožné měření, takto postupujeme až do posledního čtvrtého měření.
6. Současně se provádí kontrolní měření roztoků, vždy v první, třetí a poslední 6. hod.

4.2.3 Hodnoty log P a log D

Rozdělovací koeficient oktanol/voda P je definovaný jako poměr koncentrace látky v oktanolové fázi ke koncentraci ve vodné fázi dvoufázového systému oktanol/voda. Hodnota P je bezrozměrná a uvádí se jako log P (Rucki, 2008).

Většina známých léčiv však obsahuje ionizovatelné skupiny, a je tedy pravděpodobné, že budou nabitý při fyziologickém pH. LogP tedy pouze popisuje rozdělovací koeficient neutrálních molekul. Konstanta Log D je lepším deskriptorem lipofility molekuly při daném pH. Může být stanovena podobným způsobem jako logP použitím pufru definujícího pH. Vzhledem k zamýšlenému použití v lidském organismu byla hodnota log D predikována při pH = 7,4.

Hodnoty log D pro účely této diplomové práce nebyly zjištěny experimentálně, ale byly převzaty z webové databáze. Hodnoty pro jednotlivé látky jsou uvedeny ve výsledcích.

Hodnoty log P u látek M2 byly zjištěny pomocí freewaru MarwinSketch.

4.2.4 Rozpustnost látek v PBS a roztoku PBS/F-127 pomocí LC-MS

Za účelem sledování účinnosti roztoku F-127 jak kosolvent zvyšující rozpustnost byla náhodně vybrána látka M2-7.1, jejíž koncentrace nasyceného roztoku v PBS resp. 1% roztoku F-127/PBS byla stanovena pomocí LC-MS metody. Látka byla rozpuštěna nejprve jednak v DMSO a jednak v metanolu. Poté byla ředěna dále. Výsledná rozpouštědla měla tedy složení DMSO + PBS, DMSO + PBS + F-127, metanol + PBS a metanol + PBS + F-127.

Použité chemikálie: Pluronic F-127, PBS, Dimethylsulfoxid (dále jen DMSO), methanol (dále jen MeOH), M2-7.1, acetonitril, kyselina mravenčí

Složení LC-MS systému: binární čerpadlo s vakuovým odplyňovačem, kolonový kompartment, autosampler, UV detektor

Stacionární reverzní fáze: silikagel

4.2.4.1 Princip

4.2.4.1.1 Kapalinová chromatografie

Princip separace je založen na rozdílných interakcích mezi pohyblivou (mobilní fází) a povrchem nepohyblivé (stacionární) fáze. Vzorky jsou nastříkány do proudu mobilní fáze, která je pumpována pod vysokým tlakem do kolony naplněné stacionární fází s velkým povrchem. Dle charakteru analytů složky vzorku volně interagují s oběma fázemi. Látky se silnějšími interakcemi se stacionární fází jsou vymývány z kolony pomaleji, zatímco ty se slabší interakcí jsou volně unášeny proudem mobilní fáze a rychle eluovány z kolony. K separaci tak dochází v případě, že se liší interakce jednotlivých složek se stacionární fází, což vede k jejich vymytí v různých časových intervalech. Analyt se vyskytuje ve formě úzkého pásu s homogenní koncentrací. Po eluci z kolony je pás detekován ve formě tzv. píku, jehož plocha závisí na koncentraci analytu (Hansen, 2012) (Kazakevich, 2007).

4.2.4.1.2 Hmotnostní spektrometrie

Analyt rozpuštěný v mobilní fází je přiveden kapilárou do iontového zdroje, kde za pomoci zmlžujícího plynu (tzv. nebulizační plyn) vzniká jemný aerosol. Na kapiláru je navíc vloženo vysoké napětí (1-5 kV), proto nesou kapičky velké množství nábojů.

Odpařením rozpouštědla pomocí proudu dusíku a vysoké teploty v iontovém zdroji dochází ke snižování velikosti kapiček a zvyšování hustoty náboje na jejich povrchu, což způsobí tzv. Coulombickou explozi, během které se uvolní samotné ionty. Ionty získávají kladný náboj a za pomoci analyzátoru hmotnostního detektoru jsou separovány dle poměru hmotnosti a náboje za vzniku hmotnostního spektra (Hansen, 2012). Analyzátozem je v našem případě hybridní kvadrupól-orbitrap. Detekce je provedena UV detektorem a výsledky převedeny do počítače. Schéma výše popsaného postupu viz Obr. 15.

4.2.4.2 Postup LC-MS analýzy:

1. Nejprve navážíme 2 vzorky látky M2-7.1 po cca 2mg, první rozpustíme v metanolu a druhý v DMSO tak, aby výsledný objem činil 150 μ l.
2. K dosažení požadované zdánlivé koncentrace 100 μ M odebereme vypočtené množství a přidáme buď do PBS nebo do 1% roztoku F-127.
3. Vzorky obsahující látku a neobsahující F-127 zahřejeme na vodní lázni na 37 °C a odstředíme, vzorky obsahující F-127 pouze zahřejeme na vodní lázni. Výjimkou jsou 2 vzorky obsahující F-127, které odstředíme, abychom porovnali chování tohoto kosolventu po centrifugaci.
4. Opatrně odebereme nasycené roztoky a připravíme kontrolní vzorky použitých rozpouštědel bez rozpuštěné látky.
5. Celkem jsme tedy připravili 10 vzorků: M2-7.1/MeOH v PBS, M2-7.1/DMSO v PBS, M2-7.1/MeOH v F-127, M2-7.1/DMSO v F-127, F-127/PBS, PBS, F-127/MeOH, F-127/DMSO – těchto 8 vzorků zcentrifugujeme. Poslední 2, tedy F-127/MeOH a F-127/DMSO ponecháme bez centrifugace. Všechny jsme převedli do vialek, a takto vložili do chromatografu.

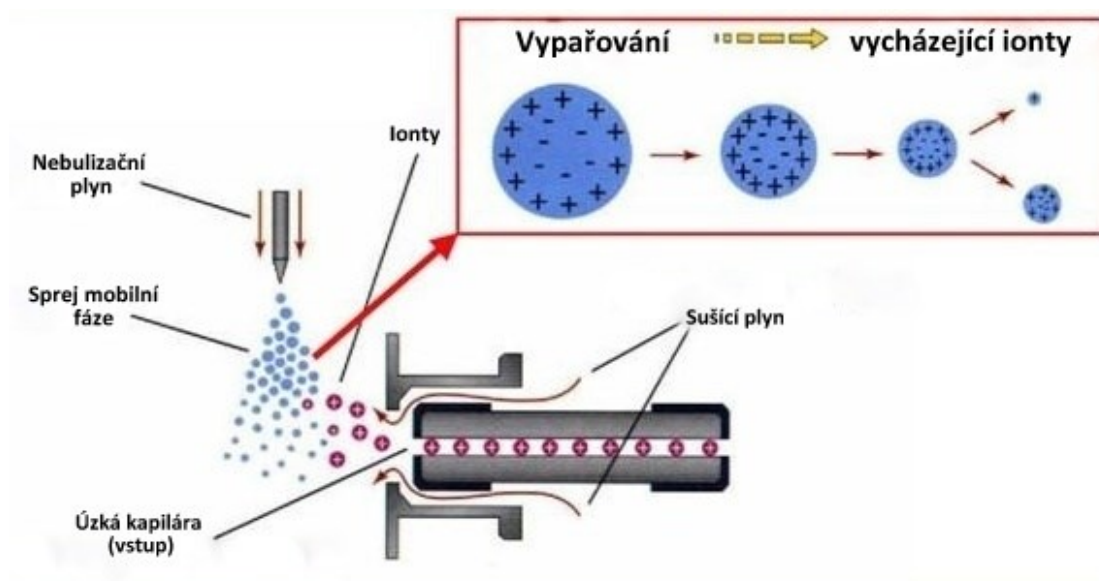
4.2.4.3 Provedení LC-MS analýzy:

Vzorky analytu M2-7.1 rozpuštěné v různých mediích (PBS, F-127) byly analyzovány pomocí LC-MS. Cílem bylo stanovit účinek vybraných aditiv na rozpustnost látky M2-7.1 a ověřit, zda nedochází během solvatace analytu k nežádoucím změnám jeho chemické struktury. Chromatografická analýza byla provedena na reverzní stacionární fázi s dvojitým endkapováním (Waters Atlantis dC18 100Å 2,1 x 100 mm/3 μ m). Pro chromatografickou eluci byl použit lineární gradient (vysokotlaký) kombinující vodu (MFA) a acetonitril (MFB), (oboje okyseleno 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí): 0–1 min: 10% MFB, 1–4min:

10 % – 100 % MFB, 4–5min: 100 % MFB, 5–7.5 min: 10 % MFB.

Z každého z našich vzorků bylo odebráno 5 μ l a nastříknuto do systému LC-MS. Teplota kolonového termostatu byla nastavena na 27 °C, teplota v automatickém dávkovači na 23 °C, průtok mobilní fáze na 0.4 ml/min. Pomocí UV detektoru byla během chromatografické analýzy zaznamenávána absorbance při 4 vlnových délkách: 210, 250, 278

a 290 nm. Sériově za UV detektorem byl zapojen hmotnostní spektrometr, pomocí kterého bylo ověřeno kvalitativní složení analyzovaných vzorků.



Obr. 15: Základní schéma ionizace elektrosprejem (ESI). Princip metody je podrobně popsán v odstavci 4.2.4.1.2 Hmotnostní spektrometrie. Modifikováno dle: (Holcapek)

4.3 Analýza dat a statistické zhodnocení

Data byla analyzována pomocí programu Excel. První den měření se stanovilo pomocí spektrofotometru absorpční spektrum a z něj vlnovou délku absorpčního maxima, při které je absorbance nejvyšší. Při zjištění vlnové délce se poté proměřily všechny vzorky z koncentrační řady včetně pufru a zaznamenaly se do Excelové tabulky. Ze vzestupné koncentrační řady roztoků se poté vytvořila kalibrační přímka.

Druhý den měření byl vytvořen kvadruplikát koncentrací pro 4 časové intervaly. Každou hodinu (celkem 4 časové body) se pak proměřovala absorbance roztoku v donorové a akceptorové části systému.

Pomocí kalibrační přímky a absorbance se vypočítala koncentrace roztoku v donorové a akceptorové části systému. Pro každý časový bod byl vypočítán z aritmetického průměru kvadruplikátu koeficient permeability P_e dle rovnice:

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

kde

Log P_e – logaritmus koeficientu permeability

$[\text{drug}]_{\text{akceptor}}$ – koncentrace látky v akceptorové části systému

$[\text{drug}]_{\text{ekvilibrum}}$ – zdánlivá koncentrace látky v systému bez bariéry

V_D – objem v donorové části systému (0,3 ml)

V_A – objem v akceptorové části systému (0,3 ml)

Area – plocha (0,28 cm²)

Time – čas (4 časové intervaly: 10800 s, 14400 s, 18000 s, 21600 s)

4 hodnoty P_e za každý časový bod byly poté průměrovány v daném měření a ze 2-3 nezávislých měření se získala výsledná hodnota P_e včetně hodnoty SD pro každou testovanou látku.

Párové hodnoty permeačního koeficientu získané v PBS a v 1% F-127 pro jednotlivá standardní léčiva byla statisticky analyzována pomocí 2way ANOVA s následným Bonferroniho posttestem v programu GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.). Hladina významnosti $P < 0,05$ je brána jako statistický významná.

5. VÝSLEDKY

5.1 Stanovení látek v PBS

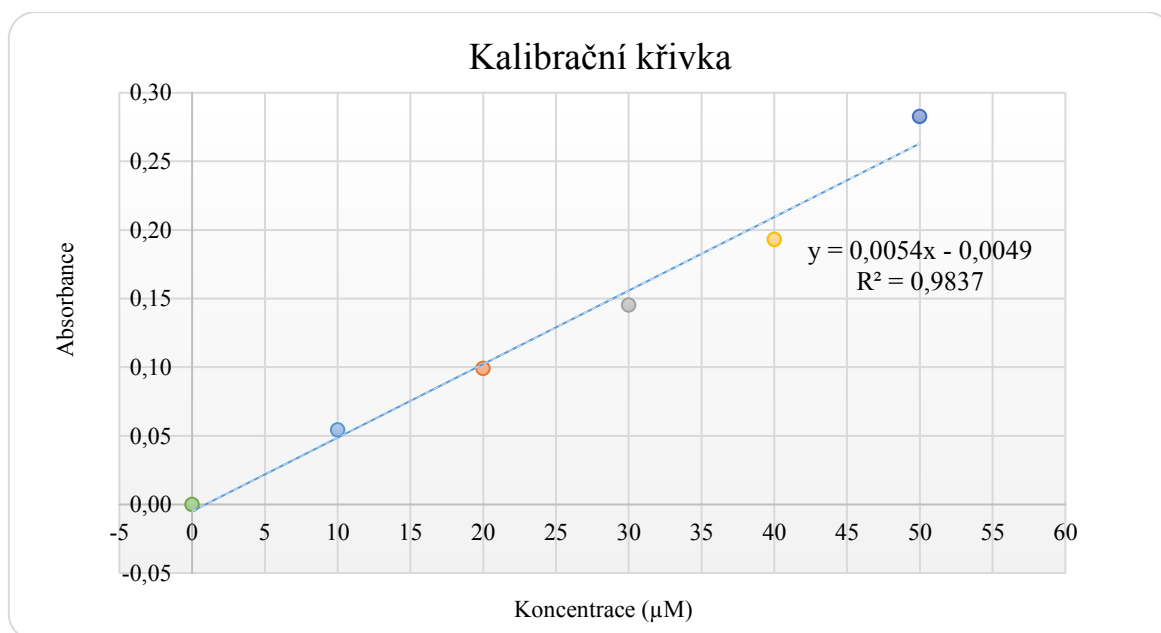
Pro pilotní PAMPA experiment byl vybrán derivát takrinu M2-9.1 a rozpuštěn za pomoci DMSO v PBS. Pro srovnání byla provedena zkouška s donepezilem, u kterého se s jistotou ví, že rozpuštěn v PBS proniká přes fosfolipidovou membránu využívanou v této eseji velmi dobře. Zároveň je zřejmé, že proniká přes HEB i v *in vivo* podmínkách.

Hodnoty potřebné ke zkoušce PAMPA pro látku M2-9.1:

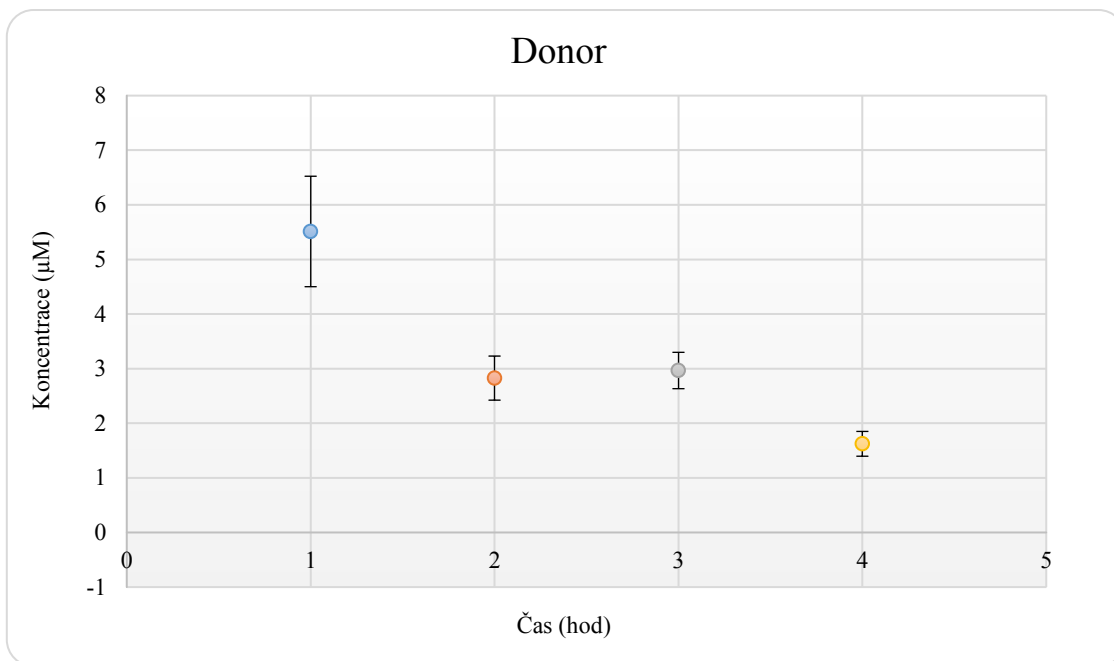
$M_r = 379,492 \text{ g/mol}$

$m = 3,52 \text{ mg}$ do 15 μl DMSO

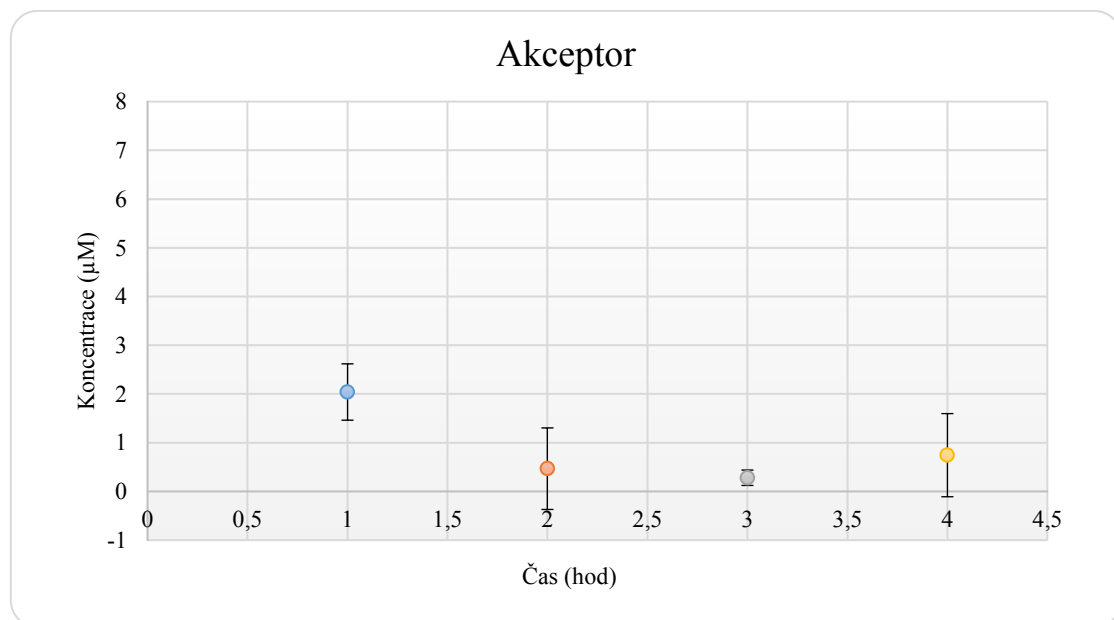
$V = 20,37 \mu\text{l}$ M2 9.1 v DMSO do 11 ml PBS



Obr. 16: Kalibrační křivka látky M2-9.1. Testovaná látka byla rozpuštěna v DMSO a poté v pufri PBS. Následně byla vytvořena vzestupná koncentrační řada o 5 hodnotách. U látky M2-9.1 činila max. koncentrace 50 μM , proto byly zvoleny hodnoty koncentrace 10, 20, 30, 40 a 50 μM a vzorky byly dle tohoto schématu naředěny. Poté byly převedeny automatickou pipetou na mikrotitrační desku, pro každou koncentraci se tímto způsobem vytvořil triplikát a změřila se absorbance každého ze vzorků při vlnové délce absorpčního maxima, která se zprůměrovala. Pro koncentraci 10 μM vyšla hodnota absorbance 0,05; pro 20 μM 0,09; pro 30 μM 0,15; pro 40 μM 0,19 a pro 50 μM 0,28 ($n = 1$).

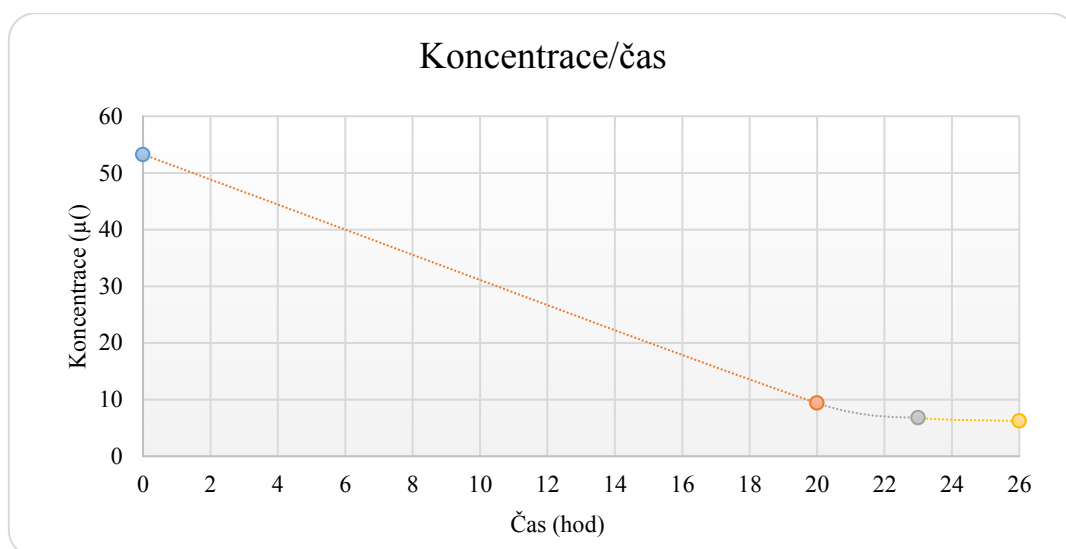


Obr. 17: Graf závislosti koncentrace donorové části látky M2-9.1 na čase v průběhu inkubace. Zobrazeny 4 hodnoty koncentrace: 5,51 µM; 2,83 µM; 2,97 µM a 1,62 µM ve 4 časových intervalech: 3., 4., 5. a 6. hod. Každá hodnota je výsledkem aritmetického průměru 4 měření, pomocí něhož byla získána směrodatná odchylka. Koncentrace vzorku s přibývajícím časem klesá ($n = 1$).



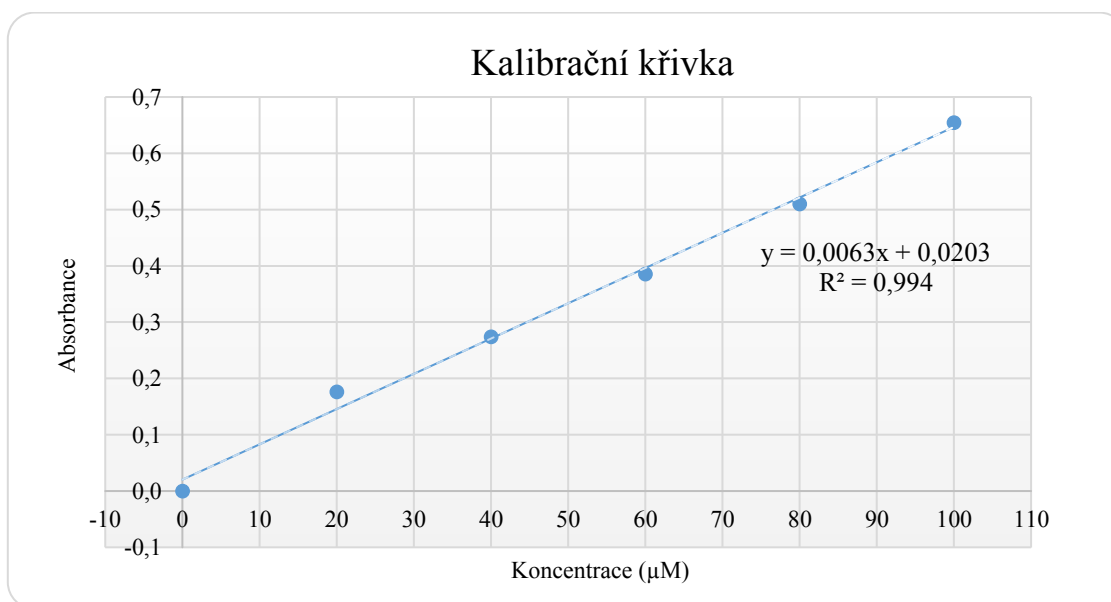
Obr. 18: Graf zobrazující závislost koncentrace akceptorové části látky M2-9.1 na čase v průběhu inkubace. Opět lze vidět 4 hodnoty koncentrace, jež byly získány z kvadruplikátu a poté zprůměrovány: 2,04 µM; 0,47 µM; 0,28 µM; a 0,74 µM. Naměřeny byly ve 4 časových bodech: 3., 4., 5. a 6. hod. Křivka by měla kolísat od sestupných hodnot po vzestupné ($n = 1$).

$$\log Pe = 2,78392 \cdot 10^{-6} (\text{cm s}^{-1})$$



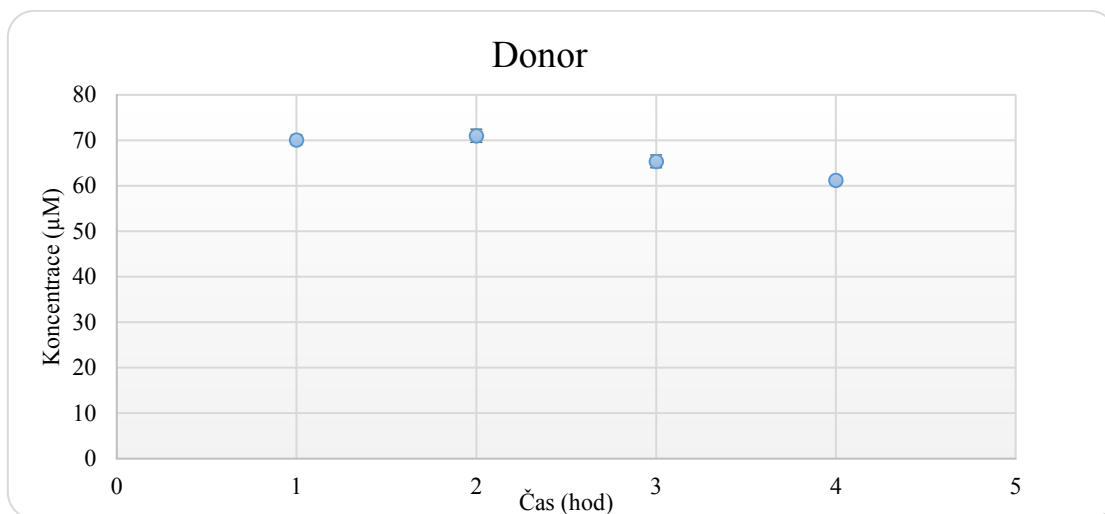
Obr. 19: Graf závislosti koncentrace látky M2-9.1 na čase pro kontrolní vzorky. První koncentrace 53,25 µM byla získána z triplikátu hodnot, které byly naměřeny v čase přípravy vzorku a poté zprůměrovány. Další 3 hodnoty koncentrace: 9,36 µM; 6,77 µM a 6,22 µM byly naměřeny následující den v rozmezí 3 hod., tedy ve 20., 23. a 26. hod. a získány totožným způsobem ($n = 1$).

K porovnání jsou níže zobrazeny grafy pro donepezil (Obr. 20, Obr. 21, Obr. 22 a Obr. 23):

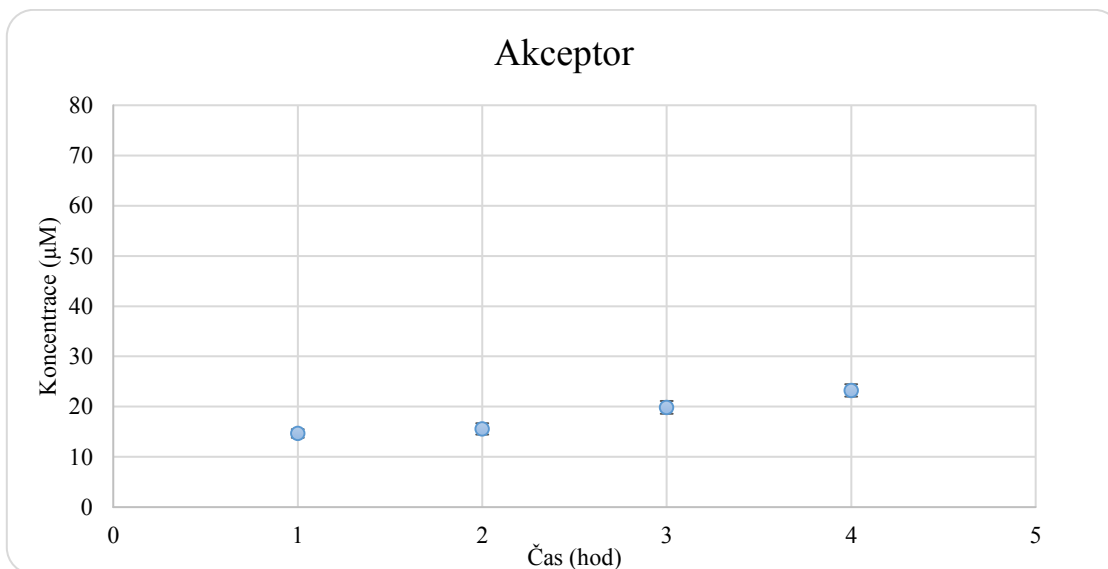


Obr. 20: Kalibrační křivka donepezilu. Vytvořila se vzestupná koncentrační řada o 5 hodnotách. Max. koncentrace donepezilu byla 100 µM, proto byly zvoleny hodnoty koncentrace 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM a 100 µM a vzorky byly dle tohoto schématu naředěny. Poté byly převedeny mikropipetou na mikrotitrační desku, každá hodnota koncentrace 3x, změřila se absorbance každého ze vzorků a hodnoty se

zprůměrovaly. Pro koncentraci 20 μM činila hodnota absorpance 0,18; pro 40 μM 0,27; pro 60 μM 0,39; pro 80 μM 0,51 a pro 100 μM 0,65 ($n = 1$).

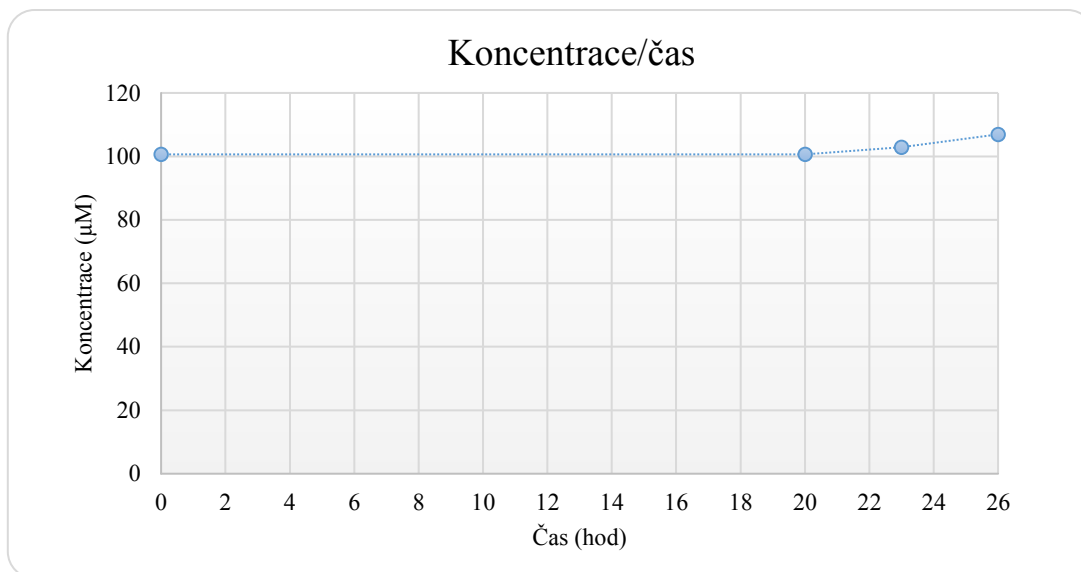


Obr. 21: Graf závislosti koncentrace donorové části donepezilu na čase v průběhu inkubace. Zobrazeny 4 hodnoty koncentrace: 70,10 μM ; 71,01 μM ; 65,38 μM a 61,21 μM ve 4 časových intervalech: 3., 4., 5. a 6. hod. Všechny hodnoty koncentrací byly získány z aritmetického průměru 4 měření. Z následujícího grafu lze vidět, že koncentrace vzorku v donorové části systému s přibývajícím časem klesá ($n = 1$).



Obr. 22: Graf zobrazující závislost koncentrace akceptorové části donepezilu na čase v průběhu inkubace. Opět lze vidět 4 hodnoty koncentrace s hodnotami: 14,66 μM ; 15,57 μM ; 19,86 μM ; a 23,23 μM ve 4 časových bodech: 3., 4., 5. a 6. hod., které byly získány z kvadriplikátu a vypočítán jejich průměr. Křivka akceptorové části systému s přibývajícím časem vzestupně stoupá ($n = 1$).

$$\log Pe = 9,42075 \cdot 10^{-6} (\text{cm s}^{-1})$$



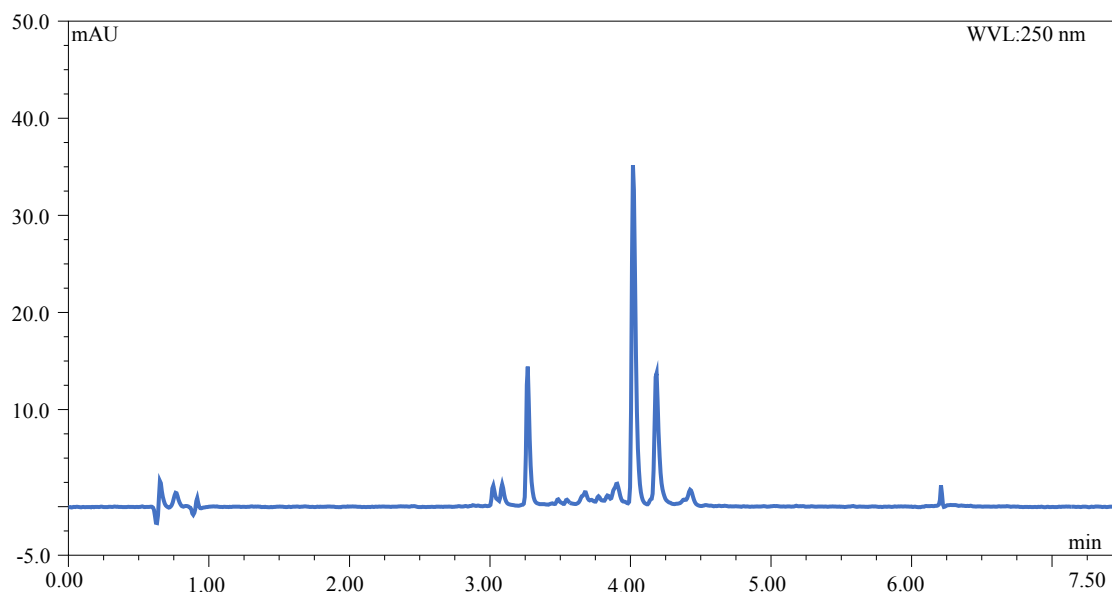
Obr. 23: Graf závislosti koncentrace donepezilu na čase u kontrolních vzorků. První koncentrace 100,64 µM byla naměřena v čase přípravy vzorku a další 3: 100,64 µM; 102,92 µM a 106,94 µM byly naměřeny následující den v rozmezí 3 hod., tedy ve 20., 23. a 26. hod. Všechny hodnoty koncentrace byly vypočítány z aritmetického průměru 3 naměřených hodnot ($n = 1$).

5.2 Využití F-127 jako kosolvent

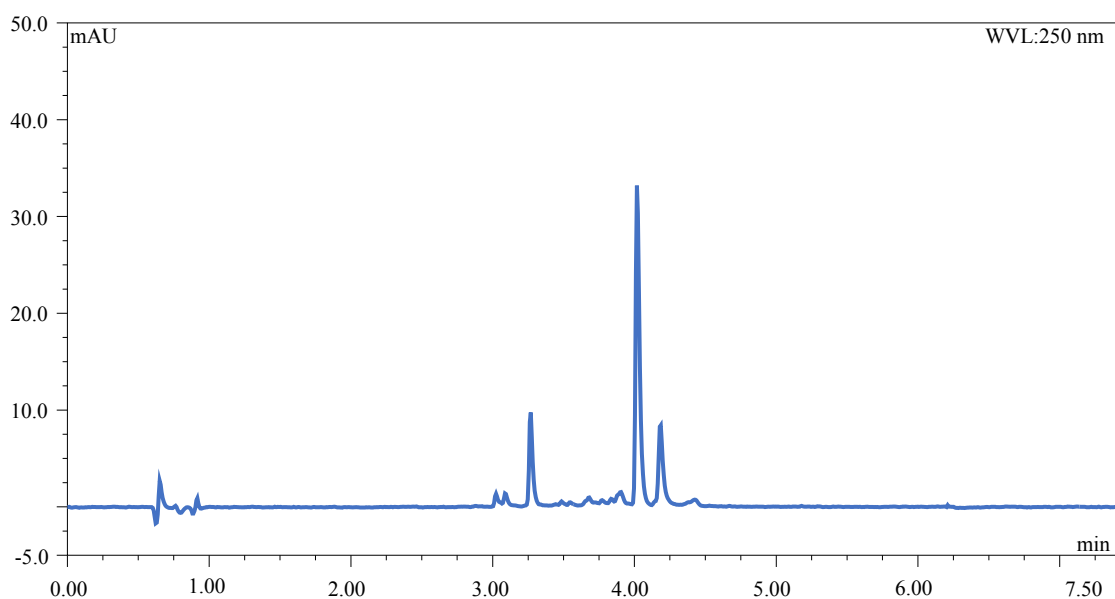
Na základě výsledků pilotního experimentu se předpokládá, že se látky M2 budou rozpouštět v PBS velmi obtížně, resp. látka se rozpustí, ale při delším stání dochází k precipitaci v roztoku. Tato časová nestálost je však pro stanovení prostupnosti přes fosfolipidovou membránu nevhodná z důvodu stanovení ve 4 různých časových bodech a nízké koncentrace jsou detekovatelné pomocí UV/VIS metody s relativně velkou chybou.

Proto naším dalším krokem bylo pokusit se najít kosolvent, který by zvýšil koncentraci látek v donorové a akceptorové jamce vzhledem k citlivosti UV/VIS metody a zajistil vyšší stabilitu zásobního roztoku.

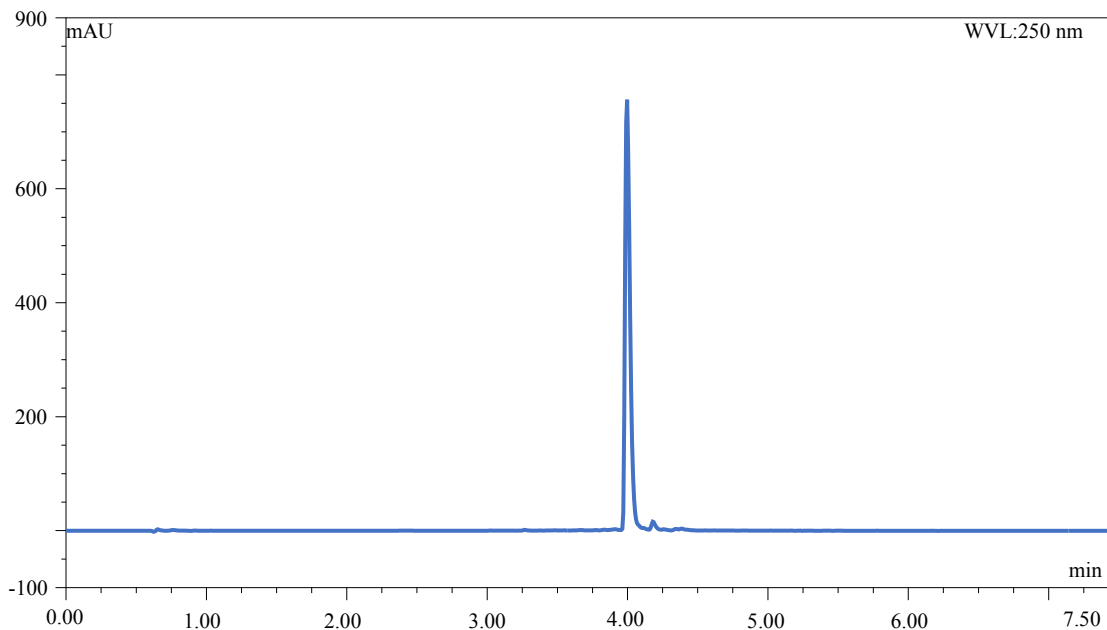
Do PBS byl rozpuštěn Pluronic F-127 tak, aby vznikl 1% roztok F-127. Účinnost tohoto rozpouštědla byla otestována na látce M2-7.1, přičemž koncentrace nasyceného roztoku v PBS resp. v 1% F-127 byla změřena pomocí LC-MS-systému.



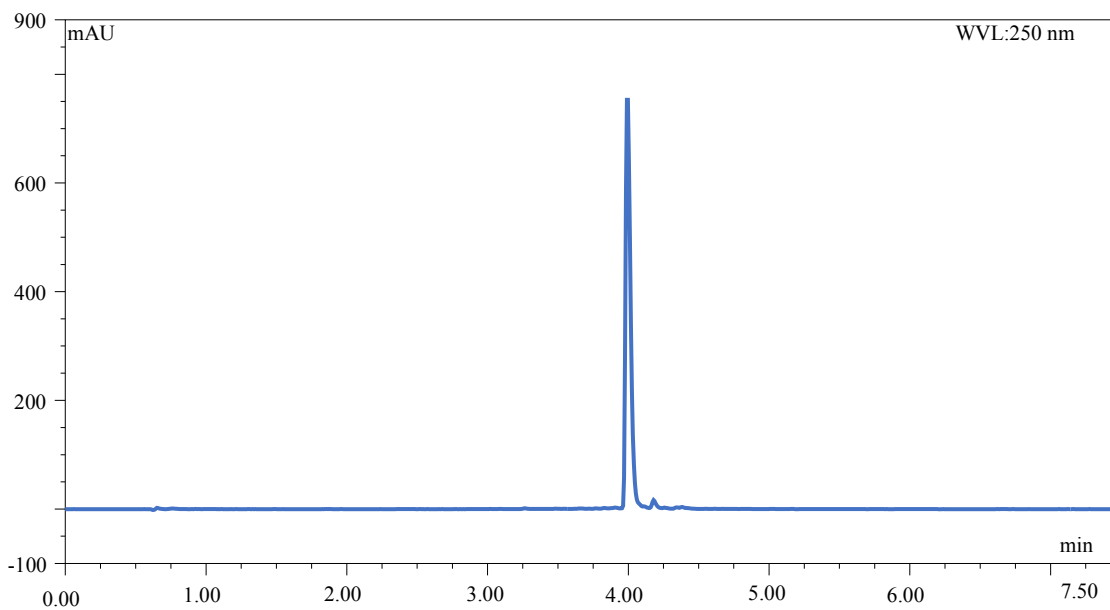
Obr. 24: Chromatograf zobrazující závislost absorpce (mAU) látky M2-7.1 v PBS rozpuštěnou pomocí DMSO na retenčním čase (min).



Obr. 25: Chromatograf znázorňující závislost absorpce (mAU) látky M2-7.1 v PBS rozpuštěnou pomocí MeOH na retenčním čase (min).



Obr. 26: Chromatograf závislosti absorpce (mAU) roztoku M2-7.1 v 1% F-127 rozpuštěného pomocí DMSO na retenčním čase (min).



Obr. 27: Chromatograf znázorňující závislost roztoku M2-7.1 v 1% F-127 rozpuštěného v MeOH na retenčním čase (min).

Jak lze pozorovat na chromatogramech (viz Obr. 24, Obr. 25, Obr. 26 a Obr. 27), 1% roztok F-127 dokázal více než desetinásobně zvýšit koncentraci látky M2-7.1. Pomocí tohoto

experimentu se tedy dospělo k závěru, že 1% roztok F-127 by mohl sloužit jako výhodný kosolvent testovaných látek a pomohl by tak lépe rozpouštět testované M2 látky.

5.2.1 Vliv lipofility léčiva na jeho rozpustnost

Vliv lipofility na rozpustnost testované látky M2-7.1 v těchto 2 různých rozpouštědlech (PBS a 1% roztok F-127) se studoval na sérii standardních léčiv. Lipofilita léčiva byla vyjádřena hodnotou log P a log D 7,4.

Vždy se současně provedlo i rozpuštění látky v PBS na zdánlivě stejnou koncentraci a hodnoty absorbance nasycených roztoků se v obou rozpouštědlech porovnály (Tab. 1). Z tabulky je mj. patrné, že látky s výraznou lipofilitou se díky přísadku F-127 rozpouštěly lépe, avšak toto tvrzení neplatí absolutně.

Název látky	<i>A</i> v PBS	<i>A</i> v F-127	log P	log D 7,4	Abs. maximum (nm)	Poměr <i>A</i> PBS/F-127
<i>donepezil</i>	0,91	0,87	3,60	2,79	270	1,05
<i>testosteron</i>	1,03	1,01	3,32	3,16	250	1,28
<i>hydrokortizon</i>	1,14	1,16	1,79	2,41	250	0,98
<i>piroxikam</i>	1,07	1,05	3,06	0,46	350	1,02
<i>teofylin</i>	0,72	0,67	-0,10	-0,03	270	1,07
<i>atenolol</i>	0,18	0,17	0,16	-1,85	270	1,06
<i>chlorpromazin</i>	0,75	0,75	5,40	3,42	310	1,00
<i>imipramin</i>	0,23	0,27	4,01	2,64	250	0,85
<i>desipramin</i>	0,74	0,55	4,90	1,58	250	1,36
<i>estradiol</i>	0,03	0,06	4,01	3,62	280	0,48
<i>progesteron</i>	0,49	0,53	3,87	3,72	250	0,94

7-MEOTA	0,56	0,71	3,40	0,80	250	0,79
---------	------	------	------	------	-----	------

Tab. 1: Hodnoty absorbance v rozpouštědlech PBS a F-127, hodnoty log P, log D 7,4, vlnová délka absorpčního maxima a poměr absorbance standardních látek v PBS a F-127.

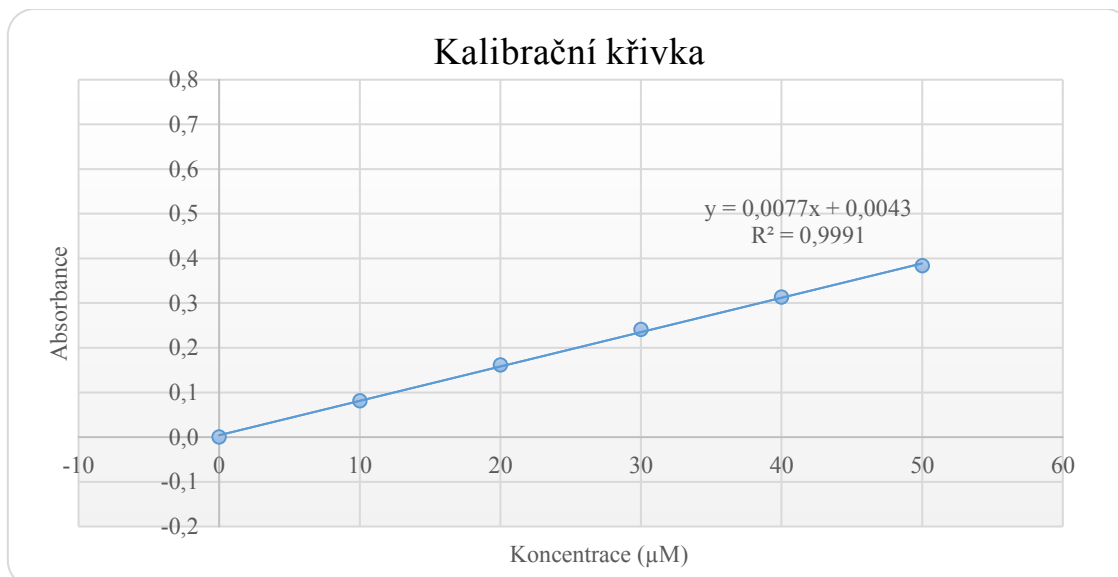
Obdobně bylo postupováno u testovaných látek ze série M2 (Tab. 2). Dle poměru absorbancí je patrné, že látky se díky přidavku F-127 rozpouštěly výrazně lépe.

Název látky	A v PBS	A v F-127/PBS	log D 7,4	Abs. maximum (nm)	Poměr A PBS/F-127
M2 7.1	0,11	0,59	5,51	320	0,19
M2 9.1	0,29	0,39	3,61	320	0,74
M2 10.1	0,42	0,40	3,66	320	1,05
M2 11.2	0,27	0,50	5,25	320	0,54
M2 12.1	0,35	0,41	4,99	330	0,85
M2 15.1	0,09	0,50	6,89	340	0,18
M2 21.1	0,22	0,38	5,04	320	0,58
M2 22.1	0,16	0,47	3,78	330	0,34
M2 30.1	0,28	0,42	3,84	320	0,67

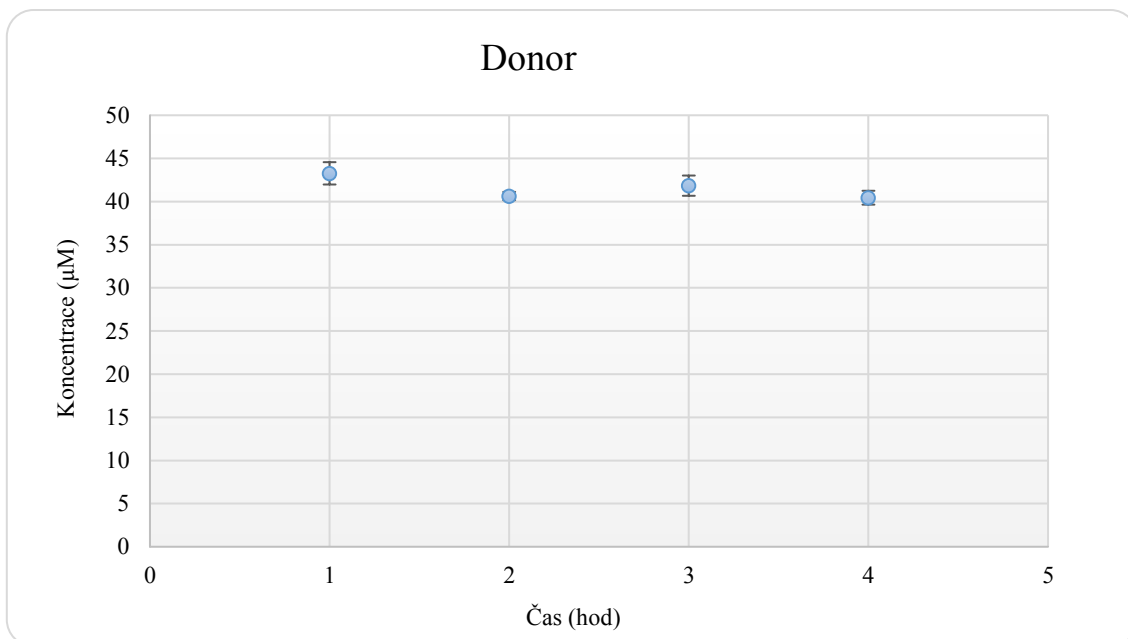
Tab. 2: Hodnoty absorbance M2 látek v PBS a 1% F-127, log D při pH 7,4; maximální vlnové délky v absorpčním maximu a poměr absorbance vypočítaný podílem absorbance látek v PBS a 1% F-127.

5.3 Zkouška PAMPA za využití F-127

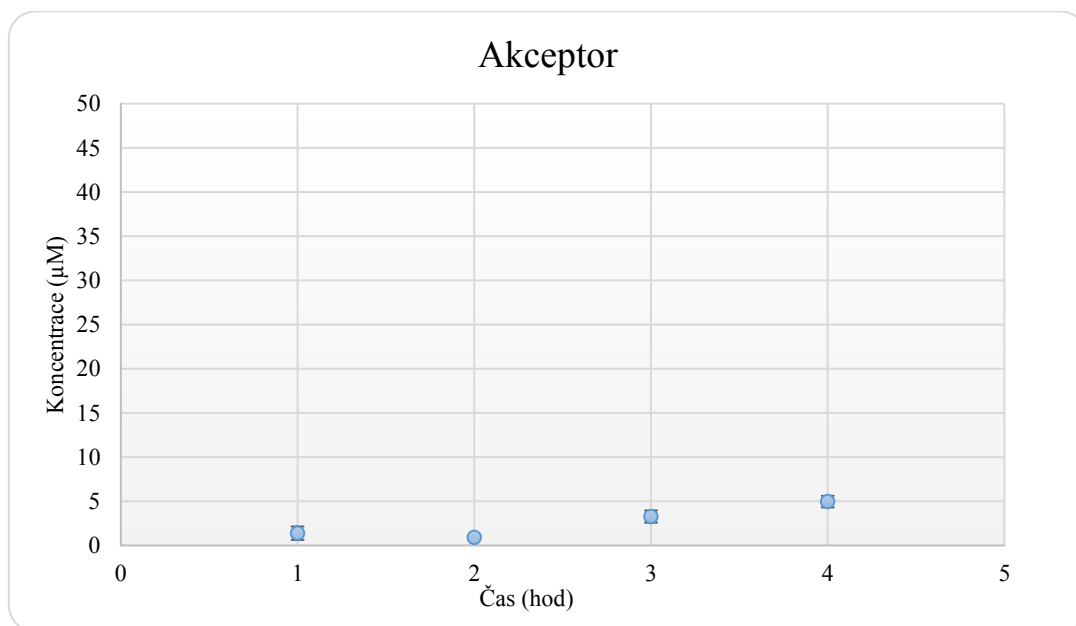
Níže jsou uvedené ilustrační grafy PAMPA eseje testované látky M2-9.1 za využití kosolventu F-127 v PBS (Obr. 28, Obr. 29, Obr. 30 a Obr. 31). Z Obr. 29 je patrné, že látka v čase měla mnohem „stabilnější“ koncentraci, než tomu bylo v případě, kdy byl jako rozpouštědlo využito PBS (viz Obr. 17).



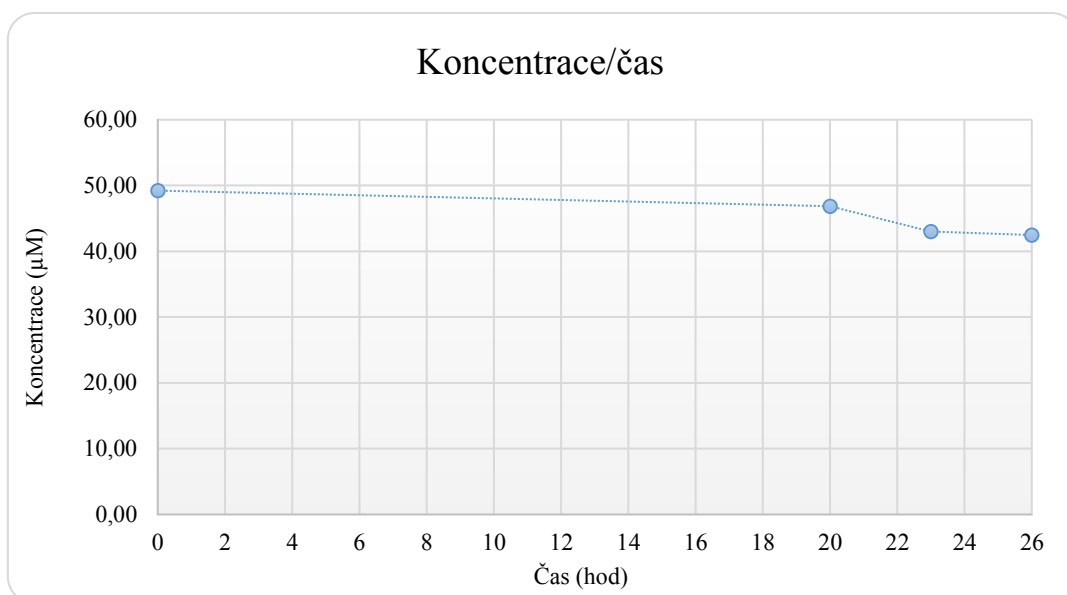
Obr. 28: Kalibrační křivka látky M2-9.1 rozpuštěné v PBS s přidavkem F-127. Byla vytvořena vzestupná koncentrační řada s 5 hodnotami koncentrací. Max. koncentrace této látky byla 50 µM, proto byly zvoleny hodnoty koncentrace 10, 20, 30, 40 a 50 µM a vzorky byly dle tohoto schématu naředěny. Poté byly převedeny mikropipetou na mikrotitrační desku, vždy triplikát všech uvedených koncentrací, a změřila se absorbance každého ze vzorků, který se zprůměroval: Pro koncentraci 10 µM vyšla hodnota absorbance 0,08; pro 20 µM 0,16; pro 30 µM 0,24; pro 40 µM 0,31 a pro 50 µM 0,38 ($n = 1$).



Obr. 29: Graf závislosti koncentrace donorové části látky M2-9.1 rozpuštěné v 1% PBS/F-127 na čase v průběhu inkubace. Zobrazeny 4 hodnoty koncentrace: 43,27 µM; 40,64 µM; 41,84 µM a 40,45 µM ve 4 časových intervalech: 3., 4., 5. a v 6. hod. Každá hodnota je výsledkem aritmetického průměru 4 měření. Koncentrace vzorku v donorové části systému s přibývajícím časem klesá ($n = 1$).



Obr. 30: Graf zobrazující závislost koncentrace akceptorové části látky M2-9.1 v PBS/F-127 na čase v průběhu inkubace. V grafu lze vidět 4 hodnoty koncentrace, získané z aritmetického průměru kvadruplikátu: 1,39 µM; 0,90 µM; 3,27 µM; a 4,96 µM ve 4 časových bodech: 3., 4., 5. a 6. hod. Křivka akceptorové části systému by měla kolísat od sestupných hodnot po vzestupné ($n = 1$).



Obr. 31: Graf závislosti koncentrace látky M2-9.1 na čase pro kontrolní vzorky. První koncentrace 49,23 µM byla naměřena v čase přípravy vzorku a další 3: 46,84 µM; 42,99 µM a 42,47 µM byly naměřeny následující den v rozmezí 3 hod., tedy ve 20., 23. a 26. hod. Všechny koncentrace byly získány jako aritmetický průměr triplikátu každé z nich ($n = 3$).

5.3.1 Permeabilita Pe

Výpočet hodnoty Pe vycházel ze 4 časových bodů měřených vždy v kvadruplikátu, tedy 4 různých koncentrací v donorových a akceptorových jamkách. Hodnoty v rámci kvadruplikátu byly zprůměrovány. Průměr 4 hodnot Pe v různých časových intervalech poskytl výslednou hodnotu Pe v rámci jednoho měření. Výsledná hodnota $Pe \pm SD$ byla získána ze 2-3 nezávislých měření. Ilustrativně znázorněno pro látku M2-9.1 v Tab. 3 a Tab. 4.

Číslo měření M2-9.1 v 1% F-127	R^2 pro kalibrační křivku	$Pe * 10^{-6} (cm s^{-1})$ $\pm SD$
1.	0,9991	1,9 ± 0,88
2.	0,9986	1,4 ± 0,55

Tab. 3: Hodnota R^2 v kalibrační křivce a hodnoty Pe pro látku M2-9.1.

<i>Pe</i> ($\cdot 10^{-6}$)	\pm <i>SD</i>
1,65	0,72

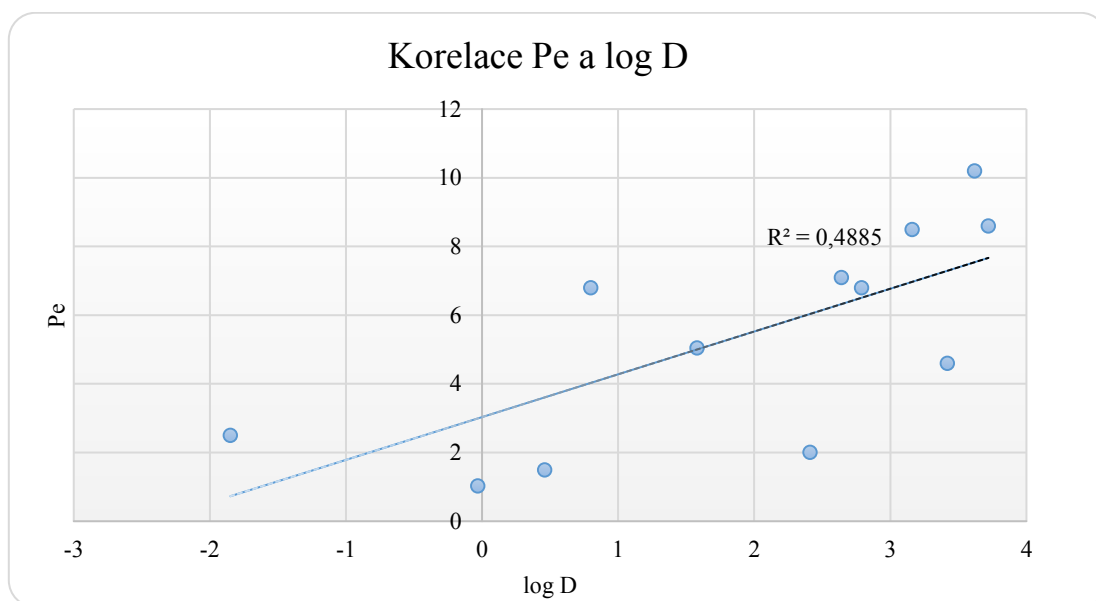
Tab. 4: Průměr *Pe* ze 2 měření látky M2-9.1 uvedených v tabulce 3.

Pomocí použitých standardních léčiv se zjišťovalo, zda přídavek 1% roztoku F-127 nemění hodnoty *Pe*, resp., zda neposouvá obvykle používaná rozmezí hodnot pro predikci dostupnosti v CNS (viz Tab. 5).

<i>Standardní látka</i>	<i>Pe</i> v PBS \pm <i>SD</i> ($\cdot 10^{-6}$) (cm s^{-1})	<i>Pe</i> v F-127 \pm <i>SD</i> ($\cdot 10^{-6}$) (cm s^{-1})	<i>Poměr Pe</i> PBS/F-127 ($\cdot 10^{-6}$) (cm s^{-1})
<i>donepezil</i>	8,90 \pm 1,46	8,1 \pm 0,60	1,10
<i>testosteron</i>	11,60 \pm 1,67	8,50 \pm 1,37	1,36
<i>hydrokortizon</i>	2,60 \pm 0,40	2,01 \pm 0,91	1,29
<i>piroxikam</i>	1,80 \pm 0,25	1,50 \pm 0,17	1,20
<i>teofylin</i>	0,70 \pm 0,40	1,03 \pm 0,44	0,68
<i>atenolol</i>	0,91 \pm 0,65	2,43 \pm 1,98	0,38
<i>chlorpromazin</i>	4,70 \pm 0,81	4,60 \pm 0,88	1,02
<i>imipramin</i>	9,50 \pm 0,99	7,10 \pm 2,45	1,33
<i>desipramin</i>	6,21 \pm 1,60	5,05 \pm 1,34	1,23
<i>estradiol</i>	14,50 \pm 3,50	10,20 \pm 1,00	1,42
<i>progesteron</i>	10,80 \pm 0,82	8,60 \pm 0,52	1,26
<i>7-MEOTA</i>	6,50 \pm 1,85	5,80 \pm 0,79	1,12

Tab. 5: Hodnoty *Pe* standardních látek v PBS a 1% F-127, spolu s hodnotami směrodatných odchylek *SD* a poměrem těchto permeabilit. Tyto údaje byly získány z aritmetického průměru kvadruplikátu koncentrací v donorové a akceptorové části systému a následně

vypočítané pomocí vzorce pro koeficient Pe uvedeného v části Analýza dat a statistické zhodnocení.



Obr. 32: Graf znázorňující korelaci hodnot Pe a $\log D$ pro standardní látky uvedené v Tab. 5. I přesto že dle koeficientu determinance $R^2 = 0,4885$ nevykazuje korelace lineární trend, lze uvést, že hodnota $\log D$ každého léčiva jeho permeabilitu do jisté míry ovlivňuje.

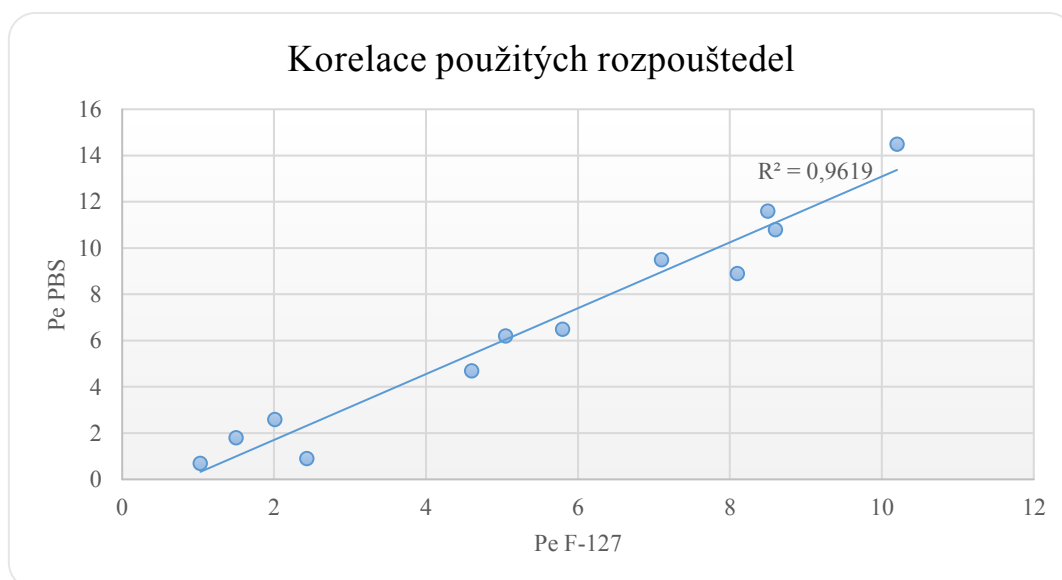
Nové látky série M2 byly změřeny zkouškou PAMPA, díky jejich špatné rozpustnosti, pouze v 1% roztoku F-127 (viz Tab. 6).

<i>Testovaná látka</i>	<i>Pe v F-127 (*10⁻⁶) (cm s⁻¹) ± SD</i>
M2-7.1	9,25 ± 2,62
M2-9.1	1,65 ± 0,35
M2-10.1	4,85 ± 0,07
M2-11.2	2,28 ± 0,82
M2-12.1	2,37 ± 0,66
M2-15.1	2,35 ± 0,35

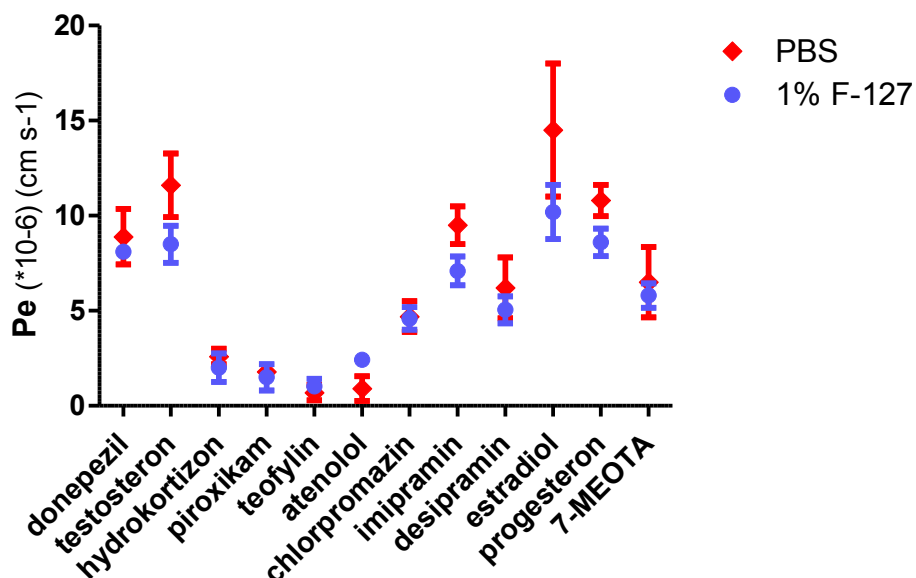
M2-21.1	$3,08 \pm 1,21$
M2-22.1	$1,8 \pm 0,14$
M2-30.1	$2,6 \pm 0,86$

Tab. 6: Hodnoty Pe testovaných látek rozpuštěné v 1% roztoku F-127 společně s hodnotou směrodatné odchylky SD. Hodnoty Pe M2 látek v 1% F-127 byly získané totožným způsobem jako v tabulce 5 pro standardní látky.

Vzhledem k tomu, že druh rozpouštědla může ovlivňovat výsledné hodnoty koeficientu Pe například tím, že tento kosolvent může „rozpuštět“ i hydrofobní fosfolipidovou vrstvu, extrapolovaly se výsledky Pe získané v F-127 do podmínek PBS. K tomu se využily hodnoty Pe standardních léčiv v PBS a 1% roztoku F-127 z Tab. 5 a vytvořily se z nich pro porovnání následující grafy (Obr. 32, Obr. 33). Na Obr. 32 je zobrazena korelace hodnot koeficientu permeability Pe získaných pro standardní léčiva v rozpouštědle PBS resp. 1% F-127. Jak je patrné z hodnoty koeficientu determinance ($R^2 = 0,9619$), korelace vykazuje prakticky lineární trend. Na Obr. 33 jsou tyto hodnoty porovnány a ze statistického zhodnocení Bonferroniho posttestem bylo zjištěno, že nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi jednotlivými rozpouštědly.



Obr. 33: Na obrázku lze vidět korelaci hodnot permeačního koeficientu Pe získané pro standardní léčiva, v rozpouštědle PBS resp. F-127. Jak je patrné z hodnoty koeficientu determinance ($R^2 = 0,9619$), získané hodnoty v obou rozpouštědlech vykazují lineární trend. Jednotlivé body reprezentují průměrné hodnoty Pe pro jednotlivá léčiva ($n = 2-3$).



Obr. 34: Párové hodnoty Pe pro standardní léčiva v PBS resp. v 1% F-127. Dle standardní analýzy rozptylu (ANOVA, $P < 0,001$) a Bonferroniho posttestu bylo zjištěno, že rozdíl mezi použitými rozpouštědly není statisticky významný u žádného léčiva ($P > 0,05$). Data jsou prezentována jako průměr \pm SD; $n = 2-3$.

Vzhledem k výše uvedenému nesignifikantnímu rozdílu mezi Pe v PBS a Pe v 1% roztoku F-127 u standardů tedy lze extrapolovat predikci prostupu M2 látek v PBS dle hodnot Pe standardních látek v PBS uvedených v Tab. 5. Porovnali jsme hodnoty Pe v 1% F-127 u standardních a testovaných látek, našli podobné hodnoty Pe a stanovili tak předpokládanou pravděpodobnost prostupu M2 látek v PBS přes HEB pomocí známé permeace standardních látek v PBS (viz Tab. 7).

<i>Testovaná látka</i>	<i>Predikce prostupu M2 látek v PBS</i>
M2-7.1	+
M2-9.1	-
M2-10.1	+
M2-11.2	+/-

M2-12.1	+/-
M2-15.1	+/-
M2-21.1	+/-
M2-22.1	-
M2-30.1	+/-

Tab. 7: V tabulce je zobrazena předpokládaná predikce dostupnosti M2 látek do CNS. Predikce prostupu každé M2 látky přes HEB, která by byla rozpuštěna v PBS, byla získána extrapolací se standardním léčivem solubilizovaným v PBS, jež vykazovalo přibližně srovnatelnou Pe v 1% F-127, a u něhož je predikce prostupu přes HEB klinicky známá.

6. DISKUSE

Metoda PAMPA je jednou z *in vitro* metod ke stanovení predikce prostupu látek přes HEB (Schmidt and Lynch, 2003). I přes svou relativní jednoduchost a reprodukovatelnost má však řadu limitů. Jeden takový je spojen s použitím UV/VIS spektrofotometrie ke stanovení absorbance běžným spektrofotometrem využívaným pro screening více látek. Jedná se totiž o poměrně málo citlivou metodu ve srovnání se stanovením pomocí HPLC (nebo LC-MS) a je nutné, aby látka byla dostatečně rozpuštěna v rozpouštědle, resp. aby dostatečně absorbovala v UV/VIS části spektra. Další nevýhodou je predikce pouze pasivního prostupu, nikoliv aktivního transportu či funkce efluxních mechanismů. Na druhou stranu je metoda PAMPA velice rychlá, nenákladná a screeningově vhodná zkouška pro stanovení predikce prostupu látek přes HEB. Cílem této diplomové práce tedy bylo predikovat vstup BQCA derivátů přes HEB pomocí zkoušky PAMPA za použití solubilizéru 1% roztoku F-127 v PBS, korelovat výsledky s fyzikálně-chemickými vlastnostmi a porovnat P_e standardních látek se známou prostupností s P_e látek testovaných.

Na počátku měření jsme k rozpuštění testovaných látek použili fosfátový pufr PBS. Látky M2 jsou však velmi lipofilní, a proto se nám je pomocí PBS nepodařilo uspokojivě rozpustit v tom smyslu, že roztok látky nebyl v čase dostatečně stálý. Nízká rozpustnost v PBS vedla k nízkým hodnotám absorbance, která se často pohybovala na hranici limitu detekce, a výrazně se tak zvyšovala chybovost měření. Tento fakt je znázorněn na Obr. 16, Obr. 17, Obr. 18 a Obr. 19 u látky M2-9.1.

Pokoušeli jsme se tedy nalézt takové rozpouštědlo, které by vedlo ke zvýšení koncentrace v donorových a akceptorových jamkách, která je poté detekovatelná pomocí standardního spektrofotometru s výrazně nižší chybou. Nejlépe se osvědčil 1% roztok F-127, resp. směs F-127 a PBS v poměru 1:100, který dokázal zlepšit rozpustnost i takto těžce rozpustných látek, což můžeme pozorovat na Obr. 28, Obr. 29, Obr. 30 a Obr. 31.

Z těchto ilustrativních obrázků je patrné, že 1% F-127 zajistil stabilitu primárního roztoku, která se (oproti obdobnému experimentu se stejnou látkou M2-9.1 rozpuštěnou pouze v PBS) projevila jak ve zlepšené hodnotě koeficientu determinance R^2 u kalibrační křivky, tak v trendech pozorovaných v grafech popisující koncentraci donorových, resp. akceptorových jamek v různých časových bodech. Zejména ale zajišťuje „stabilitu“ koncentrace, která je u PAMPA experimentu, prováděného v rámci až 6 hod. inkubace, velmi důležitá.

Jak již bylo řečeno v kapitole 2.7, 1% F-127 je blokový kopolymer amfifilního charakteru, jehož hydrofilní část je složena ze 2 řetězců polyethylenoxidových jednotek, lemujících hydrofobní jádro z polypropylenoxidových jednotek. Za určitých podmínek vytváří polymerní micely tvořené hydrofobním jádrem a hydrofilním obalem. Dle literatury o blokových kopolymerech je solubilizace těžce rozpustných látek umožněna zadržením molekul sloučeniny uvnitř hydrofobního jádra. Obrovskou výhodou polymerních micel je jejich vysoká stabilita. Disociují se postupně i v případě, že jejich koncentrace klesne pod CMC. Velmi výhodná je tedy potenciace rozpouštění sloučenin, jak v koncentracích vyšších, než je CMC, tak nižších. Dalším neméně významným benefitem je velikost jádra, které je větší než u povrchově aktivních látek, což vede ke snadnějšímu rozpouštění léčiv (Chiappetta and Sosnik, 2007).

Z výše uvedeného by se mohlo zdát, že se jedná o velmi výhodný a snadno použitelný solubilizér, ovšem i zde jsme objevili některé limitující faktory. Po vložení do ultrazvukové lázně, která se běžně používá pro lepší rozpouštění testovaných látek, se F-127 začal rozkládat. Důvodem je pravděpodobně rozpad micel kvůli kavitaci vzniklé rozpadem jádra (Chiappetta and Sosnik, 2007). Proto jsme látky po tomto zjištění rozpouštěli pouze ve vodní lázni vyhřáté vždy maximálně na 37 °C, kde k rozkladu nedocházelo. Během dalších experimentů jsme také vizuálně pozorovali, že k rozpadu došlo pravděpodobně také při použití centrifugy (5000 ot/min).

V literatuře se s metodou PAMPA setkáváme v různých experimentálních provedeních. Jako lipidová membrána byla kromě PBL testována i PML (roztok fosfatidylcholinu v dodecanu) (Di et al., 2003). Ukázalo se, že výsledky byly srovnatelné, až na 3 sloučeniny, u kterých PML falešně predikoval sníženou schopnost prostupu skrz HEB. Proto jsme i my jako výchozí lipid použili PBL.

Zajímavá byla modifikace, která byla provedena v rámci zkoušky PAMPA, a která využívala rozpouštění testovaných sloučenin v roztoku PBS a ethanolu v poměru 70:30 (Xie et al., 2015). Dle publikovaných dat však přidávkem lipofilního rozpouštědla (etanolu) dochází ke změně P_e membrány. Domnělý mechanismus může být připisován rozpouštění PBL v tomto rozpouštědle. Proto je velmi důležité zvolit takový kosolvent, který dokáže léčiva rozpustit, aniž by výrazně ovlivnil P_e látky za běžných podmínek.

Je zřejmé, že účinnost rozpouštědel, a tedy i 1% roztoku F-127, se odvíjí od fyzikálně-chemických vlastností léčiva. Všechny testované M2 sloučeniny jsou vysoce lipofilního charakteru ($\log D > 3$), což při smísení s 1% roztokem F-127 způsobí rozptýlení molekul léčiv

skrz hydrofilní obal do hydrofobního jádra micel (Di et al., 2003). Nicméně platí, že čím více má polymerní kosolvent PEO/PPO skupin, tím menší schopnost rozpustnosti vysoce lipofilních látek vykazuje z důvodu vyšší hydrofility, což se týká právě 1% F-127.

Z Tab. 1 se standardními látkami rozpuštěnými v našich 2 pufrech vyplývá, že každá jednotlivá látka vykazuje rozdílné hodnoty absorpance v každém z pufrů nehledě na jejich lipofilitu vyjádřenou jako log P či log D. Z toho vyplývá, že 1% F-127 použitý jako kosolvent rozpouští každou z látek odlišně a zřejmě na lipofilitě léčiva vyjádřenou pomocí log P či log D tak zcela nezávisí. Z této tabulky je však patrné, že jistý trend popisující vyšší účinnost 1% F-127 na léčiva s vyšší lipofilitou pozorovat lze. Tato skutečnost je v souladu s literaturou, která definuje i jiné parametry, které jsou určující pro rozpustnost látek ve vodě kromě použitého rozpouštědla. Rozpustnost však dále ovlivňuje druh rozpouštěné látky, přítomnost dalších látek v roztoku, strukturně-konformační aspekty látky, povrchové napětí, či teplota daného prostředí (Crivori et al., 1999).

Nicméně při pohledu na Tab. 2 s absorbancí testovaných látek můžeme vidět téměř u všech M2 sloučenin, s výjimkou M2-10.1, mírné zvýšení absorpance, a tedy lepší rozpustnost látek díky přidavku F-127 do PBS. To potvrdil i vysoce citlivý a přesný test pomocí LC-MS pro látku M2-7.1 (viz Obr. 24, Obr. 25, Obr. 26 a Obr. 27).

V Tab. 5 jsou pak zobrazeny výsledné hodnoty P_e pro standardní látky v obou rozpouštědlech. Můžeme zde pozorovat pokles hodnot P_e při rozpuštění látek v 1% roztoku F-127. To může odpovídat pozorovanému trendu při použití rozpouštěcí směsi etanol/PBS, a je zde tedy riziko posunu běžně udávaných intervalů při hodnocení rozpustnosti do CNS (Xie et al., 2015).

Jelikož jsme nebyli schopni rozpustit M2 látky z důvodu jejich vysoké lipofility v PBS, nemohli jsme získat hodnoty P_e stejným postupem jako u standardních léčiv. Prostřednictvím statistické analýzy rozptylu a Bonferroniho posttestu u standardních látek (viz Obr. 33, Obr. 34) jsme dospěli k závěru, že rozdíl mezi použitými rozpouštědly není pro stanovení P_e statisticky signifikantní. Ačkoliv nebyl zaznamenán statisticky významný vztah mezi použitým rozpouštědlem, hodnoty P_e standardních látek získané v PBS resp. 1% roztoku F-127 se liší (viz Tab. 5). Z toho důvodu by se i běžně používané hranice hodnot P_e pro přestup do mozku při použití 1% F-127 mohly od těch v PBS lišit. Nelze tedy využívat tradičně používané intervaly pro látky v CNS dostupné ($P_e > 4$) a pro látky HEB neprostupující nebo prostupující jen velmi omezeně ($P_e < 2$). Díky statistické analýze lze však předpokládat, že tyto intervaly budou pro 1% roztok F-127 rozdílné pouze nepatrně. Obecně

Ize říci, že tato metoda je závislá na použitém rozpouštědle a měl by se brát důrazný zřetel i na případné kosolventy a vždy statisticky zhodnotit vliv kosolventu např. za pomoci standardních léčiv. Tento fakt byl např. ve zmiňovaném článku opomenut (Schmidt and Lynch, 2003).

Extrapolaci výsledků získaných v 1% F-127 jsme do podmínek PBS provedli korelací se standardním léčivem. Ke každé nové testované látce jsme vybrali standardní léčivo s podobnou hodnotou Pe v 1% roztoku F-127. Díky znalosti klinické dostupnosti v CNS vybrané standardní látky jsme nakonec stanovili předpokládanou pravděpodobnost dostupnosti testovaných látek do CNS. Např. látky M2-11.2 ($Pe = 2,28 \pm 0,58 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), M2-12.1 ($Pe = 2,37 \pm 0,47 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), M2-15.1 ($Pe = 2,35 \pm 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), M2-21.1 ($Pe = 3,08 \pm 0,07 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) a M2-30.1 ($Pe = 2,6 \pm 0,61 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) lze korelovat k hodnotě Pe atenololu ($Pe = 2,50 \pm 0,98 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), který dle dostupné literatury do CNS neprochází (Di et al., 2003, Wang et al., 2005), avšak pomocí zkoušky PAMPA byla predikována omezená prostupnost. Proto usuzujeme, že tyto uvedené M2 látky budou prostupovat skrz HEB pouze v omezené míře nebo vůbec. Látka M2-7.1 vykazuje v 1% F-127 hodnotu Pe ($9,25 \pm 1,80 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) srovnatelnou s progesteronem ($Pe = 8,60 \pm 0,52 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), který přes HEB dle příslušné PAMPA studie (Di et al., 2003) a klinické studie (Yoon et al., 2006) proniká snadno, což jsme prokázali také my prostřednictvím naší zkoušky PAMPA, a proto i M2-7.1 bude zřejmě do CNS prostupovat snadno. Podobně u M2-10.1 ($Pe = 4,85 \pm 0,05 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) se předpokládá snadný průnik přes HEB kvůli podobnosti Pe s desipraminem ($Pe = 5,05 \pm 0,67 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), jako velmi dobře prostupným léčivem (Wang et al., 2005), a toto tvrzení bylo potvrzeno i naší v naší PAMPA zkoušce. Hodnoty Pe posledních 2 testovaných látek M2-9.1 ($Pe = 1,65 \pm 0,25 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) a M2-22.1 ($Pe = 1,80 \pm 0,10 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) jsme korelovali k léčivu piroxikam ($Pe = 1,50 \pm 0,09 \cdot 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$), které kvůli své nízké lipofilitě není do CNS dostupný, jak dokládá literatura (Avdeef et al., 2007) i naše metoda PAMPA, proto předpokládáme, že tyto testované látky nebudou schopny přes HEB pronikat. Právě u piroxikamu se nám podařilo správně predikovat dostupnost látky do CNS v porovnání s příslušnou literaturou predikce prostupnosti dle zkoušky PAMPA, kde je uvedena schopnost látky pronikat HEB jako nejednoznačná (Di et al., 2003).

Obecně lze říci, že metoda PAMPA je relativně jednoduchou metodou k predikci prostupu látek do CNS, avšak její spolehlivost není stoprocentní. Navíc zohledňuje pouze pasivní difúzi, a nikoliv aktivní transport či efluxní mechanismy. Naše experimenty však

potvrdily obecné předpoklady u běžně používaných léčiv. Například atenolol jako hydrofilní molekula dosahuje v mozku velmi nízkých koncentrací, u naší metody pronikal skrz PBL taktéž velmi omezeně. Naproti tomu lipofilní donepezil pro léčbu AD, procházející HEB velmi dobře, u zkoušky PAMPA tuto vlastnost také potvrdil. Z toho pohledu lze i na látky série M2 pohlížet jako na predikované. Tuto skutečnost lze dobře prokázat hodnotami Pe v PBS i v 1% roztoku F-127 u jednotlivých testovaných látek. Sloučeniny M2-7.1 (viz Obr. 5) a M2-10.1 (viz Obr. 7) vykazují výrazně vyšší Pe než ostatní M2 látky (viz Tab. 6), což podle všeho souvisí s jejich strukturou. Obě sloučeniny mají ve své struktuře 2 lipofilní methoxy skupiny, M2-7.1 navíc dlouhý uhlíkatý řetězec mezi aminovou a amidovou skupinou, díky čemuž je ze všech testovaných látek nejvíce lipofilní. Nositel lipofility je také chlor, který se vyskytuje ve struktuře 3 M2 látek: M2-12.1 (viz Obr. 9), M2-15.1 (viz Obr. 10) a M-21.1 (viz Obr. 11), přičemž ty obsahují pouze jednu methoxy skupinu a hydrofobicita celé molekuly je tedy nižší. Je však potřeba zopakovat, že hydrofilita je pouze jedním, byť velmi důležitým faktorem ovlivňující rozpustnost i Pe látek.

7. ZÁVĚR

Na základě všech našich výsledků jsme dospěli k závěru, že přídavek F-127 do fosfátového pufru (PBS) nám zajistí potřebné rozpuštění testovaných látek při současném ovlivnění hodnot pro predikci prostupu HEB. Extrapolací pomocí standardních léčiv jsme však stanovili, že většina M2 látek vykazuje rozsah Pe v PBS přibližně mezi hodnotou 2-4, což značí omezený průnik skrz HEB. Pouze 2 M2 látky – 7.1 a 10.1 – vykazují hodnoty dostačující pro přestup. Je však nutno podotknout, že přídavek F-127 do PBS nám mohl interval hodnot Pe pro přestup do CNS nepatrně posunout. Z toho důvodu nelze pohlížet na M2 látky s $Pe < 2$ jako na látky absolutně neprostupující a stejně tak na M2 látky s $Pe > 4$ jako látky neomezeně dostupné do CNS. Nicméně tyto výsledky je nutné chápat pouze jako predikci a validovat je na jiném, přesnějším *in vivo* modelu.

Dále jsme potvrdili, že koeficient permeability látek nezávisí výhradně na jejich lipofilitě, ale i na dalších faktorech, jako jsou molekulová hmotnost sloučenin, povrchová aktivita látek či míra ionizace.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- ANGEVAREN, M., AUFDEMKAMPE, G., VERHAAR, H., ALEMAN, A. & VANHEES, L. 2008. Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. *Cochrane Database Syst Rev*, 3.
- AVDEEF, A., BENDELS, S., DI, L., FALLER, B., KANSY, M., SUGANO, K. & YAMAUCHI, Y. 2007. PAMPA - Critical factors for better predictions of absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96, 2893-2909.
- BURATOV, M. 2014. Brain cell regeneration might improve Alzheimer's disease symptoms [Online]. Available: <https://beyondthedish.wordpress.com/2014/03/28/brain-cell-regeneration-might-improve-alzheimers-disease-symptoms/>.
- CAVALLI, A., BOLOGNESI, M. L., MINARINI, A., ROSINI, M., TUMIATTI, V., RECANATINI, M. & MELCHIORRE, C. 2008. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 347-372.
- ChemSpider [Online]. Royal Society of Chemistry. Available: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3040.html?rid=2ad9527c-3f7b-4581-9b8b-75ed08167c36&page_num=0.
- CRARY, J. F., TROJANOWSKI, J. Q., SCHNEIDER, J. A., ABISAMBRA, J. F., ABNER, E. L., ALAFUZOFF, I., ARNOLD, S. E., ATTEMS, J., BEACH, T. G., BIGIO, E. H., CAIRNS, N. J., DICKSON, D. W., GEARING, M., GRINBERG, L. T., HOF, P. R., HYMAN, B. T., JELLINGER, K., JICHA, G. A., KOVACS, G. G., KNOPMAN, D. S., KOFLER, J., KUKULL, W. A., MACKENZIE, I. R., MASLIAH, E., MCKEE, A., MONTINE, T. J., MURRAY, M. E., NELTNER, J. H., SANTA-MARIA, I., SEELEY, W. W., SERRANO-POZO, A., SHELANSKI, M. L., STEIN, T., TAKAO, M., THAL, D. R., TOLEDO, J. B., TRONCOSO, J. C., VONSATTEL, J. P., WHITE, C. L., WISNIEWSKI, T., WOLTJER, R. L., YAMADA, M. & NELSON, P. T. 2014. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathologica*, 128, 755-766.
- CRIVORI, P., CRUCIANI, G., CARRUPT, P.-A. & TESTA, B. 1999. Predicting Blood-Brain Barrier Permeation from Three-Dimensional Molecular Structure. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 43, 2204 - 2216.
- CUMMINGS, J. L. & KAUFER, D. 1996. Neuropsychiatric aspects of Alzheimer's disease: The cholinergic hypothesis revisited. *Neurology*, 47, 876-883.
- DAVIS, K. L. & POWCHIK, P. 1995. Tacrine. *The Lancet*, 345, 625.
- DI, L., KERNS, E. H., FAN, K., MCCONNELL, O. J. & CARTER, G. T. 2003. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 223-232.
- EVANS, D. A., FUNKENSTEIN, H. H., ALBERT, M. S., SCHERR, P. A., COOK, N. R., CHOWN, M. J., HEBERT, L. E., HENNEKENS, C. H. & TAYLOR, J. O. 1989. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons: higher than previously reported. *Jama*, 262, 2551-2556.
- FISCHHOF P.K., S. B., RUTHER E, LITSCHAUER G, MOSLINGERGEHMAYR R, HERRMANN W.M. 1992. Therapeutic efficacy of pyritinol in patients with senile dementia of the Alzheimer type (SDAT) and multiinfarct dementia (MID). *Neuropsychobiology*, 26, 65-70.
- GABATHULER, R. 2010. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease*, 37, 48-57.
- GOULIAEV, A. H. & SENNING, A. 1994. Piracetam and other structurally related nootropics *Brain Research Reviews*, 19, 180-222.

- GREENLEE, W., CLADER, J., ASBEROM, T., MCCOMBIE, S., FORD, J., GUZIK, H., KOZLOWSKI, J., LI, S., LIU, C. & LOWE, D. 2001. Muscarinic agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. *Il Farmaco*, 56, 247-250.
- HANSEN, S. H., PEDERSEN-BJERGAARD, S. A RASMUSSEN, K. E. 2012. Introduction to pharmaceutical chemical analysis, Chichester, John Wiley & Sons.
- HELLINGER, E., VESZELKA, S., TOTH, A. E., WALTER, F., KITTEL, A., BAKK, M. L., TIHANYI, K., HÁDA, V., NAKAGAWA, S. & DUY, T. D. H. 2012. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood–brain barrier penetration models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82, 340-351.
- HOLCAPEK, M. Ionizační techniky [Online]. Pardubice: UPCE. Available: http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_techiky.pdf.
- CHETELAT, G., OSSENKOPPELE, R., VILLEMAGNE, V. L., PERROTIN, A., LANDEAU, B., MEZENGE, F., JAGUST, W. J., DORE, V., MILLER, B. L., EGRET, S., SEELEY, W. W., VAN DER FLIER, W. M., LA JOIE, R., AMES, D., VAN BERCKEL, B. N. M., SCHELTENS, P., BARKHOF, F., ROWE, C. C., MASTERS, C. L., DE LA SAYETTE, V., BOUWMAN, F. & RABINOVICI, G. D. 2016. Atrophy, hypometabolism and clinical trajectories in patients with amyloid-negative Alzheimer's disease. *Brain*, 139, 2528-2539.
- CHIAPPETTA, D. A. & SOSNIK, A. 2007. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: Improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66, 303-317.
- JELIC, V. & DARREH-SHORI, T. 2010. Donepezil: a review of pharmacological characteristics and role in the management of Alzheimer disease. *Clinical Medicine Insights. Therapeutics*, 2, 771.
- JIRAK, R. 2006. Psychiatrie pro praxi [Online]. Praha: Psychiatrická klinika 1.LF UK.
- JOHNSON, J. W. & KOTERMANSKI, S. E. 2006. Mechanism of action of memantine. *Current opinion in pharmacology*, 6, 61-67.
- KAZAKEVICH, Y., LOBRUTTO, R. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists, Hoboken, John Wiley & Sons.
- KUHNLINE SLOAN, C. D., NANDI, P., LINZ, T. H., ALDRICH, J. V., AUDUS, K. L. & LUNTE, S. M. 2012. Analytical and biological methods for probing the blood-brain barrier. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 5, 505-31.
- KUSUHARA, H. & SUGIYAMA, Y. 2001. Efflux transport systems for drugs at the blood–brain barrier and blood–cerebrospinal fluid barrier (Part 1). *Drug discovery today*, 6, 150-156.
- LOVESTONE, S., BOADA, M., DUBOIS, B., HULL, M., RINNE, J. O., HUPPERTZ, H. J., CALERO, M., ANDRES, M. V., GOMEZ-CARRILLO, B., LEON, T., DEL SER, T. & INVESTIGATORS, A. 2015. A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimers Disease*, 45, 75-88.
- MARCO-CONTELLAS, J., DO CARMO CARREIRAS, M., RODRÍGUEZ, C., VILLARROYA, M. & GARCÍA, A. G. 2006. Synthesis and pharmacology of galantamine. *Chemical reviews*, 106, 116-133.
- MAURER, K. & HOYER, S. 2006. Alois Alzheimer revisited: differences in origin of the disease carrying his name. *Journal of Neural Transmission*, 113, 1645-1658.
- MAYEUX, R. & STERN, Y. 2012. Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, 18.

- MENSCH, J., OYARZABAL, J., MACKIE, C. & AUGUSTIJNS, P. 2009. In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the BBB. *Journal of pharmaceutical sciences*, 98, 4429-4468.
- MORALES-GARCIA, J. A., PALOMO, V., REDONDO, M., ALONSO-GIL, S., GIL, C., MARTINEZ, A. & PEREZ-CASTILLO, A. 2014. Crosstalk between Phosphodiesterase 7 and Glycogen Synthase Kinase-3: Two Relevant Therapeutic Targets for Neurological Disorders. *Acs Chemical Neuroscience*, 5, 194-204.
- MORIYOSHI, K. & MASU, M. 1991. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*, 354, 31.
- MULLER, W. E., ECKERT, G. P. & ECKERT, A. 1999. Piracetam: Novelty in a unique mode of action. *Pharmacopsychiatry*, 32, 2-9.
- NEVSIMALOVA S, T. J., RUZICKA E. 2002. *Neurologie, Galen*.
- NITTA, A., MURASE, K., FURUKAWA, Y., HAYASHI, K., HASEGAWA, T. & NABESHIMA, T. 1993. Effects of oral administration of a stimulator for nerve growth-factor synthesis in basal forebrain-lesioned rats. *European Journal of Pharmacology*, 250, 23-30.
- O'BRIEN, R. J. & WONG, P. C. 2011. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. In: HYMAN, S. E., JESSELL, T. M., SHATZ, C. J., STEVENS, C. F. & ZOGHBI, H. Y. (eds.) *Annual Review of Neuroscience*, Vol 34. Palo Alto: Annual Reviews.
- OKEN, B. S., STORZBACH, D. M. & KAYE, J. A. 1998. The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 55, 1409-1415.
- OXENDINE, S. L., COWDEN, J., HINTON, D. E. & PADILLA, S. 2006. Adapting the medaka embryo assay to a high-throughput approach for developmental toxicity testing. *Neurotoxicology*, 27, 840-845.
- PANZA, F., FRISARDI, V., SOLFRIZZI, V., IMBIMBO, B. P., LOGROSCINO, G., SANTAMATO, A., GRECO, A., SERIPA, D. & PILOTTO, A. 2012. Immunotherapy for Alzheimer's disease: from anti-beta-amyloid to tau-based immunization strategies. *Immunotherapy*, 4, 213-238.
- PEREZ-GONZALEZ, R., PASCUAL, C., ANTEQUERA, D., BOLOS, M., REDONDO, M., PEREZ, D. I., PEREZ-GRIJALBA, V., KRZYZANOWSKA, A., SARASA, M., GIL, C., FERRER, I., MARTINEZ, A. & CARRO, E. 2013. Phosphodiesterase 7 inhibitor reduced cognitive impairment and pathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 34, 2133-2145.
- POLINSKY, R. J. 1998. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Clinical therapeutics*, 20, 634-647.
- RÖSLER, M., RETZ, W., THOME, J. & RIEDERER, P. 1998. Free radicals in Alzheimer's dementia: currently available therapeutic strategies, Springer.
- RUCKI, M., TICHY, M. 2008. Význam, historie a užití rozdělovacího koeficientu látek mezi vodu a oktan-1-ol [Online]. Praha: Státní zdravotní ústav. Available: http://www.ekomonitor.cz/sites/default/files/05_Rucki.pdf.
- SABBAGH, M. N. 2009. Drug development for Alzheimer's disease: where are we now and where are we headed? *The American journal of geriatric pharmacotherapy*, 7, 167-185.
- SALLOWAY, S., SPERLING, R. & BRASHEAR, H. R. 2014. Phase 3 Trials of Solanezumab and Bapineuzumab for Alzheimer's Disease REPLY. *New England Journal of Medicine*, 370, 1460.
- SCHMIDT, D. & LYNCH, J. 2003. Evaluation of the reproducibility of parallel artificial membrane permeation assays (PAMPA). Millipore Corporation Application Note.

- SOSA-ORTIZ, A. L., ACOSTA-CASTILLO, I. & PRINCE, M. J. 2012. Epidemiology of Dementias and Alzheimer's Disease. *Archives of Medical Research*, 43, 600-608.
- STAUD, F. & PAVEK, P. 2005. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37, 720-725.
- TARIOT, P. N., FARLOW, M. R., GROSSBERG, G. T., GRAHAM, S. M., MCDONALD, S., GERGEL, I. & GROUP, M. S. 2004. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *Jama*, 291, 317-324.
- WANG, Q., RAGER, J. D., WEINSTEIN, K., KARDOS, P. S., DOBSON, G. L., LI, J. B. & HIDALGO, I. J. 2005. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics*, 288, 349-359.
- WEINSTOCK, M. 1995. The pharmacotherapy of Alzheimer's disease based on the cholinergic hypothesis: An update. *Neurodegeneration*, 4, 349-356.
- WINBLAD, B. & MACHADO, J. C. 2008. Use of rivastigmine transdermal patch in the treatment of Alzheimer's disease. *Expert opinion on drug delivery*, 5, 1377-1386.
- WINBLAD, B. & PORITIS, N. 1999. Memantine in severe dementia: results of the 9M-best study (benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine). *International journal of geriatric psychiatry*, 14, 135-146.
- XIE, S.-S., LAN, J.-S., WANG, X.-B., JIANG, N., DONG, G., LI, Z.-R., WANG, K. D., GUO, P.-P. & KONG, L.-Y. 2015. Multifunctional tacrine-trolox hybrids for the treatment of Alzheimer's disease with cholinergic, antioxidant, neuroprotective and hepatoprotective properties. *European journal of medicinal chemistry*, 93, 42-50.
- YOON, C. H., KIM, S. J., SOO, B. S., LEE, S. C. & YOO, S. D. 2006. Rapid screening of blood-brain barrier penetration of drugs using the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column chromatography. *Journal of Biomolecular Screening*, 11, 13-20.