

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**Testovanie cytotoxicity potenciálnych liečiv na bunkových
líniách spoločne s meraním ich priechodu cez
hematoencefalickú bariéru pomocou metódy PAMPA**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jana Janočková, PhD.

Hradec Králové 2018

Lucia Šinaľová

Prehlásenie

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá na získanie iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové

Lucia Šinařová

Pod'akovanie

Touto cestou by som sa chcela poďakovať svojej konzultantke RNDr. Jane Janočkovej, PhD. a vedúcemu diplomovej práce RNDr. Jakubovi Hofmanovi, Ph.D. za vedenie pri vypracovaní diplomovej práce. Vďaka im patrí hlavne za poskytnutie cenných rád a za ochotu a čas, ktorý mi venovali pri konzultáciách. Taktiež by som sa chcela poďakovať aj mojej rodine a priateľom, ktorí ma podporovali nielen pri vypracovávaní diplomovej práce, ale aj v priebehu celého štúdia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Lucia Šinaľová

Školiteľ: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Testovanie cytotoxicity potenciálnych liečiv na bunkových líniách spoločne s meraním ich priechodu cez hematoencefalickú bariéru pomocou metódy PAMPA

V tejto diplomovej práci sme sa zaoberali prechodnosťou derivátov takrínu cez hematoencefalickú bariéru a stanovením ich cytotoxicity. Konkrétne sme testovali takrín-benzotiazolové a takrín-tiachinazolínové deriváty ako potenciálne liečivá na liečbu Alzheimerovej choroby. Dôvodom testovania nových derivátov takrínu je snaha nájsť látky s rovnakým účinkom a nižšou toxicitou, kvôli ktorej bol samotný takrín vyradený z klinického používania. Pravdepodobnú permeabilitu testovaných látok sme stanovili *in vitro* metódou PAMPA. Na základe zistených hodnôt permeačného koeficientu Pe sme z 9 testovaných derivátov takrínu určili, že benzotiazolové deriváty A-D ($Pe = 8,31-16,9 \times 10^{-6}$ cm/s) a takrín-tiachinazolínové deriváty 1, 3, 4 ($Pe = 8,59-14,9 \times 10^{-6}$ cm/s) sú cez HEB prechodné, takrín-tiachinazolínový derivát 2 ($Pe = 3,79 \times 10^{-6}$ cm/s) mal neistú permeabilitu a takrín-tiachinazolínový derivát 5 ($Pe = 2,0 \times 10^{-6}$ cm/s) bol testovaním určený ako neprechodný. V rámci predklinického hodnotenia potenciálnych liečiv je potrebné stanoviť aj ich cytotoxicitu. V diplomovej práci sme na toto stanovenie použili MTT-test. Na základe získaných IC_{50} hodnôt sme zistili, že študované benzotiazolové/tiachinazolínové takrínové deriváty vykazovali vyššiu cytotoxicitu ako samotný takrín.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lucia Šinařová

Supervisor: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Title of diploma thesis: Testing of the cytotoxicity of potential drugs in the cell lines together with the measurement of their passage through the blood brain barrier by the PAMPA method

This master thesis focuses on the prediction of tacrine derivatives permeability through blood-brain barrier and their cytotoxicity. We studied tacrine-benzothiazole and tacrine-thiaquinazoline derivatives as potential drugs for treatment of Alzheimer's disease. The reason of testing new tacrine derivatives was effort to find substances with same effect and lower toxicity, for which was the tacrine discarded from clinical practice. The probable permeability of the studied substances was determined *in vitro* by the PAMPA method. Based on the permeation coefficient values we have identified that tacrine-benzothiazole derivatives A-D ($Pe = 8,31-16,9 \times 10^{-6}$ cm/s) and tacrine-thiaquinazoline derivatives 1, 3, 4 ($Pe = 8,59-14,9 \times 10^{-6}$ cm/s) were permeable through blood-brain barrier, tacrine-thiaquinazoline derivative 2 ($Pe = 3,79 \times 10^{-6}$ cm/s) had uncertain permeability and tacrine-thiaquinazoline derivative 5 ($Pe = 2,0 \times 10^{-6}$ cm/s) was not permeable. In the pre-clinical evaluation of potential drugs their cytotoxicity should also be determined. Cytotoxicity evaluation was studied in this master thesis using MTT-test. Based on IC_{50} values we found that studied benzothiazole/thiaquinazoline derivatives showed higher cytotoxicity than tacrine alone.

Obsah

1	Zoznam skratiek	8
2	Úvod	10
3	Teoretická časť	11
3.1	Alzheimerova choroba.....	11
3.1.1	Liečba Alzheimerovej choroby	12
3.2	Hematoencefalická bariéra	13
3.2.1	Mechanizmy transportu látok cez hematoencefalickú bariéru	14
3.2.2	Farmakokinetika prechodu hematoencefalickou bariérou a distribúcia liečiv v mozgu	16
3.3	Stanovenie prechodu látok do mozgu.....	17
3.3.1	In vivo metódy stanovenia prechodnosti látok do centrálnej nervovej sústavy 18	
3.3.2	Stanovenie prechodu látok do mozgu in vitro a in silico metódami	22
3.3.2.1	Test paralelného membránového prenikania	22
3.3.2.2	Ostatné in vitro a in silico metódy na stanovenie prechodu látok cez hematoencefalickú bariéru	25
4	Cieľ práce	27
5	Experimentálna časť	28
5.1	Použité chemikálie.....	28
5.2	Použitá bunková línia	28
5.3	Použité prístroje	28
5.4	Testované látky	28
5.5	Metódy práce.....	30
5.5.1	Príprava roztokov testovaných látok na meranie	30
5.5.2	Test paralelného membránového prenikania.....	30
5.5.2.1	Zostrojenie kalibračnej krivky	30
5.5.2.2	Predpoklad prechodu látok cez hematoencefalickú bariéru	31
5.5.3	Kultivácia adherentných buniek.....	33
5.5.4	MTT test	34
6	Výsledky.....	36
6.1	Test paralelného membránového prenikania	36
6.2	MTT-test.....	39

7	Diskusia	43
8	Záver	46
9	Použitá literatúra	47

1 Zoznam skratiek

7-MEOTA - 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín

AChE - acetylcholinesteráza

APP - amyloidný prekursorový proteín

BBMEC - endoteliálne bunky izolované zo šedej mozgovej hmoty hovädzieho dobytky

BUI - index vychytávania mozgom

CNS - centrálna nervová sústava

CVO - cirkumventrikulárne orgány

DMSO - dimetylsulfoxid

FBS - fetálne hovädzie sérum

FDA - Správa potravín a liečiv

HEB - hematoencefalická bariéra

HPLC - vysokoúčinná plynová chromatografia

IAM - metóda imobilizovanej umelej membrány

LC/MS - kvapalinová chromatografia/hmotnostná spektrofotometria

MD - molekulová dynamika

MDCK – adherentná bunková línia získaná z obličiek psa

MRI - magnetická rezonancia

MTT - metyltetrazolyová soľ

NMDA receptory - N-metyl-D-aspartátové receptory

PAMPA - test paralelného membránového prenikania

PAMPA-HEB - test paralelného membránového prenikania cez hematoencefalickú bariéru

PAMPA-GIT - test paralelného membránového prenikania cez gastrointestinálny trakt

PBMC - endoteliálne bunky izolované zo šedej mozgovej hmoty ošípaných

PBL - polárny mozgový lipid

PET - pozitronová emisná tomografia

PML - membránový lipid

PS produkt - permeabilita povrchom plochy

QAR - kvantitatívna autorádiografia

QSAR - kvantitatívny vzťah štruktúra-aktivita

SPECT - jednofotónová emisná výpočtová tomografia

2 Úvod

V súčasnosti sa venuje veľká pozornosť hľadaniu nových liečiv na terapiu Alzheimerovej choroby. Dôvodom je čoraz častejší výskyt tohto ochorenia v populácii a to, že doteraz neexistuje účinná terapia, ktorá by túto neurodegeneratívnu chorobu dokázala úplne vyliečiť. Schválené sú len liečivá, ktoré dokážu spomaliť priebeh ochorenia. Patria k nim napríklad donepezil, rivastigmín a galantamín, inhibítory acetylcholinesterázy (AChE), ktoré zvyšujú koncentráciu acetylcholínu v CNS a memantín, antagonist N-metyl-D-aspartátových (NMDA) receptorov, ktorý znemožňuje väzbu glutamátu a bráni tak jeho neurotoxicite.

Prvým schváleným liečivom na liečbu Alzheimerovej choroby bol takrín, podobne ako donepezil, rivastigmín a galantamín pôsobí ako inhibítor AChE. Kvôli svojej hepatotoxicite a nepríjemným dyspeptickým ťažkostiam, ktoré spôsoboval, bol vyradený z používania. Preto je snaha syntetizovať nové deriváty takrínu, ktoré by tieto negatívne účinky nevykazovali. V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na takrín-benzotiazolové a takrín-tiachinazolínové deriváty.

Jednou zo základných podmienok účinku látok v CNS je ich prechod hematoencefalickou bariérou (HEB), ktorého pravdepodobnosť sa meria v rámci predklinického výskumu liečiv *in vitro*, *in vivo* alebo *in silico* metódami. Najčastejším parametrom určujúcim pravdepodobnosť prechodu je $\log BB$, ktorý môže byť stanovený *in vivo* metódami, medzi ktoré zaradujeme intravenóznú injekčnú techniku, určenie indexu vychytávania mozgom, mozgovú perfúziu, mikrodialýzu, metódu kvantitatívnej rádiografie alebo použitie externých detekčných metód. Tieto metódy sú však časovo, finančne, materiálne a technicky náročné, preto je snaha vyvíjať nenáročnejšie *in vitro* a *in silico* metódy. Práve týmto podmienkam vyhovuje nami použitá metóda PAMPA. Jej výhodami sú vysoká výkonnosť, reproduktibilita, cenová prijateľnosť a použitie malého množstva vzorky. Na druhej strane, metóda PAMPA napodobňuje len pasívnu difúziu, teda nezohľadňuje možný aktívny transport látok.

V rámci experimentálnej časti diplomovej práce sme určili pravdepodobnosť prechodu takrín-benzotiazolových a takrín-tiachinazolínových derivátov a taktiež sme stanovili cytotoxicitu týchto látok.

3 Teoretická časť

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je chronické neurodegeneratívne ochorenie, zväčša začínajúce stratou krátkodobej pamäte. S rozvojom choroby sa pridávajú ďalšie príznaky ako problémy s rečou, dezorientácia, zmeny nálad, neschopnosť starať sa o seba a regulovať správanie. Príčina Alzheimerovej choroby nie je doteraz úplne objasnená. Diskutuje sa o viacerých faktoroch, ktoré ovplyvňujú rozvoj tejto choroby (Burns, Iliffe, 2009).

U pacientov s Alzheimerovou chorobou bola zistená znížená hladina acetylcholínu, čo je spôsobené buď jeho nedostatočnou tvorbou alebo jeho zvýšeným odbúraním. V CNS je acetylcholinergný systém zodpovedný hlavne za tvorbu krátkodobej pamäte. Acetylcholín vzniká v cytozole nervového zakončenia ako výsledok reakcie cholínu a acetylkoenzýmu A za prítomnosti enzýmu acetylcholintransferázy, ktorého aktivita je v priebehu ochorenia znížená. Na druhej strane je acetylcholín po uvoľnení do synaptickej štrbiny a následnej väzbe na receptory odbúraný enzýmom AChE, ktorý je pri ochorení tvorený nadmerne. Prvé liečivá používané na liečbu Alzheimerovej choroby pôsobili ako inhibítory AChE. V súčasnosti sú z tejto skupiny liečiv registrované galantamín, donepezil a rivastigín (Jiráček, 2009).

Ďalším problémom objavujúcim sa pri Alzheimerovej chorobe je zvýšené uvoľňovanie glutamátu, ktorý sa viaže na NMDA-receptory. Následne je spustený kaskádovitý dej, ktorý vedie k neuronálnej apoptóze. Dlhodobé pôsobenie na NMDA-receptory zabezpečuje učenie, ktoré je pri hyperexcitácii rušené. Na zníženie škodlivého vplyvu glutamátu je registrovaný memantín, ktorý pôsobí ako antagonist NMDA-receptorov, čím bráni väzbe glutamátu na receptor (Jiráček, 2009).

Na ostatné patologické faktory typické pre pacientov s Alzheimerovou chorobou zatiaľ nebola objavená účinná farmakoterapia. Častým nálezom u pacientov sú neurotoxicky pôsobiace alzheimerovské plaky vytvorené ukladaním proteínu β -amyloid, ktorý je tvorený štiepením amyloidného prekursorového proteínu (APP) (Hardy, Allsop, 1991). Typickou intracelulárnou zmenou u pacientov s Alzheimerovou chorobou je taktiež tvorba neurofibrilárnych spleťí, ktorých základnou zložkou je tau proteín. Dochádza k nabúraniu štruktúry cytoskeletu, čo spôsobí narušenie neuronálneho transportu, teda aj komunikácie medzi neurónmi a ich následnú apoptózu (Iqbal, 2005).

Taktiež bol dokázaný aj genetický podklad tohto ochorenia. Len približne 0,1 % prípadov Alzheimerovej choroby je spôsobené autozomálne dominantnou dedičnou formou. Pri tejto forme dochádza k mutácii génov pre APP, presenilín 1 alebo 2. Následkom mutácii je tvorba β -amyloidov A β 42, ktoré sú hlavnou zložkou alzheimerovských plakov (Gatz et al., 2006). Pri ostatných geneticky podmienených prípadoch zohrajú dôležitú úlohu environmentálne a genetické faktory. Najznámejším genetickým rizikovým faktorom vo väčšine populácií je dedičnosť ϵ 4 alely pre apolipoproteín E. Avšak závislosť medzi dedičnosťou ϵ 4 alely pre apolipoproteín E a výskytom Alzheimerovej choroby nebola dokázaná v populácii Yoruba v Nigérii, čo dokazuje vplyv prostredia na Alzheimerovu chorobu (Hall et al., 2006).

3.1.1 Liečba Alzheimerovej choroby

Jedným z dôvodov, prečo je Alzheimerovej chorobe venovaná pozornosť v rámci výskumu je, že doteraz nebola vyvinutá žiadna liečba, ktorá by dokázala toto ochorenie vyliečiť alebo spomaliť jej progres. Registrované sú len liečivá, ktoré môžu mierniť symptómy tohto ochorenia.

Najčastejšie používanými liečivami pri terapii Alzheimerovej choroby sú inhibítory AChE, ktoré účinkujú tak, že blokujú odbúravanie acetylcholínu a tým zvyšujú jeho neurotransmisiu v cholinergných synapsiách, čím redukujú kognitívny deficit u pacientov s Alzheimerovou chorobou (Szymański et al., 2013).

Prvým schváleným inhibítorom AChE na liečbu Alzheimerovej choroby bol takrín. AChE blokuje tak, že sa reverzibilne viaže na serín v aktívnom centre enzýmu a taktiež vykazuje efekt na muskarínových M₁, M₂ a nikotínových receptoroch (Flynn, Mash, 1989). Z farmakokinetického hľadiska má nelineárnu farmakokinetiku, rýchlo sa absorbuje z GIT a ľahko prechádza cez HEB. Metabolizovaný je v pečeni cytochrómom P450, konkrétne jeho izoenzýmami CYP1A2 a CYP2D6 a vylučovaný obličkami s eliminačným polčasom 3 hod. (Crismon, 1994).

Aj keď takrín preukázal v štúdiách zlepšenie kognitívnych schopností pacientov s Alzheimerovou chorobou, v súčasnosti nie je registrovaný žiaden liečivý prípravok s touto účinnou látkou. Dôvodom sú závažné negatívne účinky, hlavne hepatotoxicita, kvôli ktorej bol nutný monitoring pečňových enzýmov a vysoká incidencia cholinergných negatívnych účinkov, hlavne GIT symptómov ako nauzea, zvracanie, hnačka a abdominálna bolesť (Wagstaff, McTavish, 1994). Z týchto dôvodov je snaha syntetizovať a testovať nové deriváty takrínu, ktoré by tieto negatívne účinky

nevykazovali. Príkladom takých látok sú 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridín (7-MEOTA) a od neho odvodené deriváty (Korabecny et al., 2014). Taktiež medzi ne patria *bis*-takrínové analógy, deriváty, kde sú 2 molekuly takrínu prepojené alkylénovým reťazcom alebo hybridné takrínové deriváty, ktoré vznikli prepojením takrínu s inými molekulami. Medzi tieto látky zaradzujeme napríklad takrín-donepezilové deriváty, trimetoxybenzénové deriváty takrínu alebo takrín-indolové deriváty (Kozurkova et al., 2011).

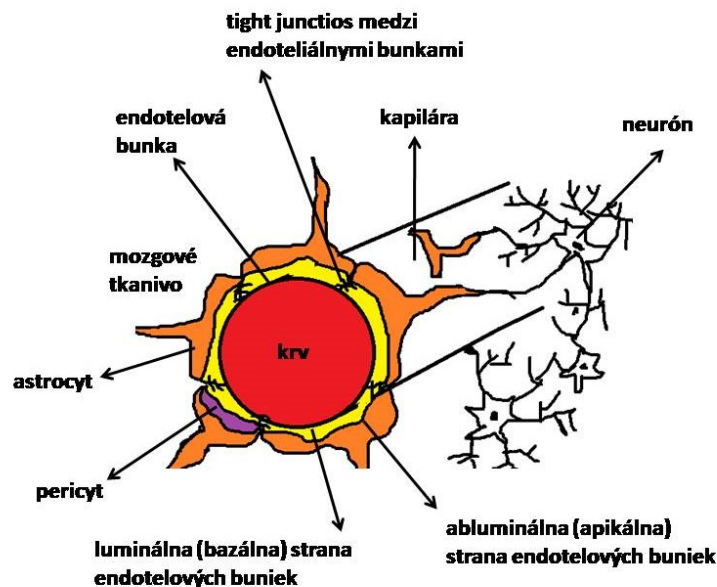
3.2 Hematoencefalická bariéra

HEB je fyziologická, vysoko selektívna semipermeabilná membrána vyskytujúca sa medzi centrálnou nervovou sústavou (CNS) a krvným obehom. Najdôležitejšími funkciami HEB sú zabezpečovanie výživy CNS, udržiavanie homeostázy mozgového tkaniva a ochrana mozgového tkaniva pred prestupom škodlivých látok a mikroorganizmov. Hydrofóbná povaha HEB umožňuje prienik lipofilných, nepolárnych látok, zatiaľ čo hydrofilné, polárne látky prechádzajú cez HEB len v prípade, že majú na endotelových bunkách príslušné transportéry (Omidi, Barar, 2012).

Niektoré časti mozgu nie súchránené HEB. Príkladom sú cirkumventrikulárne orgány (CVO), medzi ktoré patrí *area postrema*, subfornikálny orgán, cievny orgán *lamina terminalis*, označované ako senzorické CVO a *eminetia mediana*, epifýza a tri laloky hypofýzy, označované ako sekrečné CVO. Tým, že sú kapiláry týchto orgánov permeabilné, je umožnené rýchle rozpoznanie prichádzajúcich signálov systémovou cirkuláciou senzorickými orgánmi a uľahčený transport signálov (vo forme hormónov) odchádzajúcich zo sekrečných CVO (Gross, 1992).

Funkciu HEB zabezpečujú dve zložky. Prvá zložka je mechanická, ktorá pozostáva z endotelových buniek spojených tesnými spojmi, tzv. *tight junctions*. Ďalšími súčasťami mechanickej zložky HEB sú bazálna membrána endotelových buniek, astrocyty, podporné bunky s výbežkami, kde jeden výbežok je uchytený na stene kapiláry a druhý sa dotýka neurónu. Tieto súčasti zabezpečujú homeostázu CNS a výživu neurónu (Omidi, Barar; 2012). Pericyty obaľujú kapiláry a zabezpečujú vaskulárnu stabilitu, prietok a čistenie krvi od toxických bunkových produktov (Winkler et al., 2011). Schématické znázornenie jednotlivých štruktúr mechanickej zložky HEB je na Obr. 1. Druhou zložkou, ktorá zabezpečuje funkcie HEB, je funkčná zložka tvorená transportérmi nachádzajúcimi sa na endotelových bunkách. Sú obsiahnuté ako na luminálnej (smerom ku krvi), tak aj na abluminálnej (smerom k mozgovému moku)

strane endotelových buniek. Transportéry zabezpečujú najmä influx a eflux endogénnych a exogénnych látok cez HEB (Hammarlund-Udenaes et al, 2008).



Obr. 1 Schématické znázornenie štruktúr tvoriacich HEB.
(Modifikované podľa: Omid, Barar, 2012).

3.2.1 Mechanizmy transportu látok cez hematoencefalickú bariéru

Prechod látok cez HEB ovplyvňuje mnoho fyzikálno-chemických vlastností a biologických faktorov, a to najmä molekulová hmotnosť prachádzajúcich látok, lipofilita, pKa a v neposlednom rade schopnosť prechádzajúcej látky tvoriť vodíkové väzby.

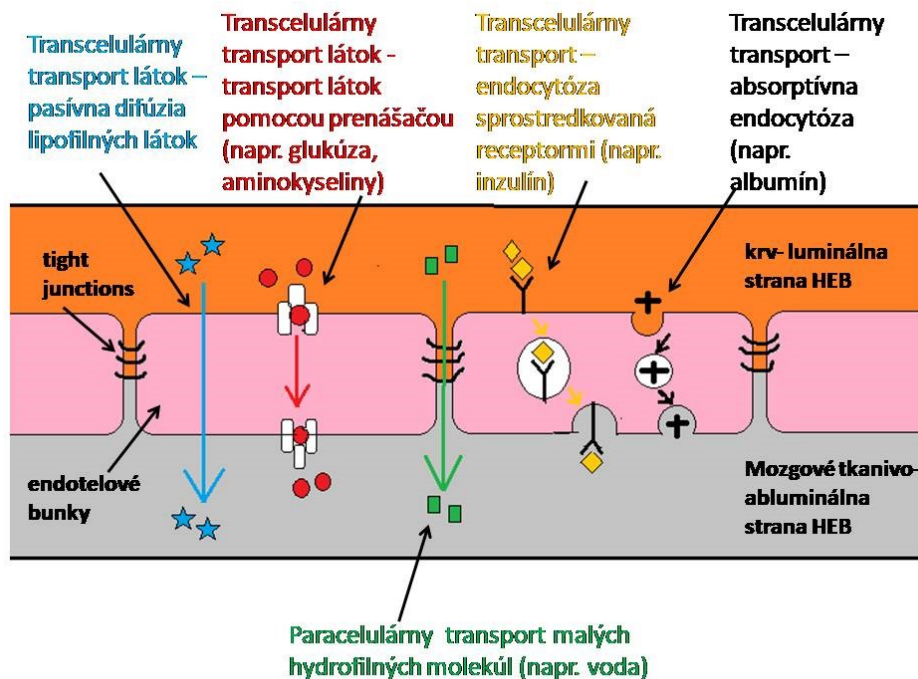
Transport látok cez HEB prebieha paracelulárne aj transcelulárne. Jedným zo základných rozdielov medzi týmito druhmi transportu je, že paracelulárny transport prebieha výhradne pasívne. Transcelulárny transport môže byť pasívny (bez využitia energie) aj aktívny (s využitím energie). Paracelulárne prechádzajú cez HEB len malé hydrofilné molekuly, čo je spôsobené prítomnosťou *tight junctions* medzi endotelovými bunkami. Transcelulárny aktívny transport cez HEB zabezpečujú hlavne transportéry a iónové kanály. Štruktúrne patria medzi membránové molekuly (Stamatovic et al., 2008). Jednotlivé druhy transportu sú znázornené na Obr.2.

V rámci dodávok živín z krvi do mozgu sa uplatňujú influxné transportéry, ako sú napríklad glukózový GLUT1 transportér alebo aminokyselinový LAT1 transportér (transportér pre veľké neutrálne aminokyseliny). Transport látok taktiež ovplyvňujú

efluxné transportéry. Príkladom efluxného transportéra je P-glykoproteín, ktorý sa nachádza na luminálnej strane endotelových buniek. Jeho funkciou je brániť vstupu niektorých potenciálnych neurotoxínov do mozgu. Avšak spôsobuje problémy vo vývoji nových liečiv pôsobiacich v CNS, pretože znižuje ich koncentráciu v mozgu tým, že buď bráni ich vstupu do CNS alebo zapríčiňuje vytlačenie liečiv, ktoré sa už dostali do cytoplazmy endoteliálnych buniek, späť do krvi (Aller et al, 2009). Okrem transportérov nájdeme na endotelových bunkách aj iónové kanály, ktoré sa zapájajú do procesu produkcie a uvoľňovania vazoaktívnych látok, konkrétne oxidu dusného alebo prostacyklínov (Stamatovic et al., 2008).

Endogénne a exogénne makromolekuly sú transportované do mozgu endocytózou (Obr. 2), ktorá je sprostredkovaná buď receptormi alebo elektrostatickými silami. Látka, ktorá prechádza bariérou prostredníctvom endocytózy, sa vnorí do plazmatickej membrány, ktorá ju obalí a v tejto forme je transportovaná do vnútra bunky. Kationické makromolekuly preferujú vychytávanie klatrínom obalenými membránami a tak sú dopravené do CNS a následne degradované v lyzozómoch. Anionické makromolekuly, medzi ktoré patrí väčšina plazmatických bielkovín, sú transportované z apikálnej strany HEB na bazálnu v kalveolových mechúrikoch. Mechúriky sú tvorené plazmatickou membránou potiahnutou štruktúrnym proteínom kalveolínom 1 (Stamatovic et al., 2008).

Malé lipofilné molekuly, teda aj väčšina liečiv, ktoré sa dostávajú do mozgu, prechádzajú cez HEB pasívnou difúziou (Obr. 2) po koncentračnom gradiente (z miest s vyššou koncentráciou do miest s nižšou koncentráciou) alebo elektro-chemickom gradiente bez využitia energie (Omid Barar, 2012).



Obr. 2 Schématické znázornenie druhov transportu látok cez HEB.

(Modifikované podľa: Omid, Barar, 2012).

3.2.2 Farmakokinetika prechodu hematoencefalickou bariérou a distribúcia liečiv v mozgu

Na popis správania liečiv v organizme slúži farmakokinetická analýza, ktorá popisuje absorpciu, distribúciu a elimináciu liečiv pomocou farmakokinetických parametrov. Liečivá sú v krvi prítomné v neviazanej forme alebo taktiež vo forme viazanej na plazmatické proteíny. Medzi viazanou a neviazanou formou liečiva sa však vytvára dynamická rovnováha, takže väzba liečiva na plazmatické bielkoviny nezabráni prechodu cez HEB, len spomalí rýchlosť, akou sa to stane.

Medzi farmakokinetické parametre, ktorými sa popisuje transport liečiv do CNS, okrem iných patrí permeačná clearance do mozgu (CL_{in}), pomer koncentrácie neviazaného liečiva v mozgu a krvi ($K_{p,uu}$) a objem, ktorý popisuje vnútromozgovú distribúciu ($V_{u, brain}$) (Hammarlund-Udenaes et al, 2008).

CL_{in} vyjadruje rýchlosť transportu látok cez HEB. Na jeho meranie sa používajú viaceré metódy. *In situ* štúdiá mozgovej perfúzie a index vychytávania mozgom (= brain uptake index, BUI) sú rýchle techniky, ktoré merajú celkovú koncentráciu látky v mozgu takmer hneď po absorpcii. Taktiež sa využívajú mikrodialyzačné techniky, intravenózna injekčná technika a meranie na bunkových kultúrach. Ak je permeačná rýchlosť pre dané

liečivo vysoká, znamená to, že bude v mozgu zabezpečená rýchla rovnováha transportu cez HEB, čo však nie je nutné pre centrálny účinok, keďže väčšina liečiv pôsobiacich v CNS sa užíva pravidelne (Hammarlund-Udenaes et al, 2008).

$V_{u, \text{brain}}$ popisuje akumuláciu liečiva v mozgu, konkrétne nešpecifické viazanie na komponenty mozgového tkaniva v závislosti na voľnej frakcii liečiva (neviazanej na krvné bielkoviny) v tkanivovom moku. Distribúcia liečiv do mozgu môže byť meraná dvoma technikami. Mikrodialýzou sa meria koncentrácia liečiva v mozgomiechovom moku (teda liečiva neviazaného na plazmatické bielkoviny) a celková koncentrácia liečiva v mozgu. *In vitro* metódou krájania mozgového tkaniva (z angl. brain slice technique) sa narezané mozgové tkanivo inkubuje 5 hod pri 37° C v tlmivom roztoku, v ktorom je rozpustená testovaná látka a následne sa meria daná koncentrácia tejto látky v tlmivom roztoku (Loryan et al, 2013).

$K_{p,uu}$ patrí medzi najrelevantnejšie parametre na stanovenie farmakokinetiky látok v CNS. Tento pomer preukazuje prítomnosť aktívneho transportu liečiv a jeho kvalitatívny význam. Je vyjadrený nasledujúcou rovnicou:

$$K_{p,uu} = \frac{AUC_{u, \text{brainISF}}}{AUC_{u, \text{plasma}}} = \frac{CL_{in}}{CL_{out}}$$

kde $AUC_{u, \text{brainISF}}$ je plocha pod krivkou závislosti koncentrácie na čase pre liečivo neviazané na krvné bielkoviny v mozgomiechovom moku, $AUC_{u, \text{plasma}}$ je plocha pod krivkou závislosti koncentrácie na čase pre liečivo neviazané na krvné bielkoviny v krvi, CL_{in} je influxová clearance a CL_{out} je efluxová clearance. Z tohto vzťahu vyplýva, že keď sú $CL_{in} \cong CL_{out}$, liečivo bude dominantne transportované pasívnou difúziou. Ak je $CL_{in} > CL_{out}$, testované liečivo bude dominantne aktívne influxované do mozgu a ak je $CL_{in} < CL_{out}$, bude prevládať dominantný aktívny eflux. Jedinou *in vivo* metódou, ktorou sa určuje $K_{p,uu}$ je mikrodialýza (Deguchi, 2002).

3.3 Stanovenie prechodu látok do mozgu

Na meranie prechodu látok cez biologické bariéry boli vyvinuté *in vivo*, *in vitro* a *in silico* metódy, ktorými sa merajú parametre vypovedajúce o prechode látok cez tieto bariéry. Najbežnejším parametrom používaným na predikciu prechodu látok do mozgu je pomer koncentrácie látky meranej v mozgu ku koncentrácii látky nameranej v krvi. Tento pomer je vyjadrený ako $\log BB$ a predstavuje distribúciu látky medzi mozgom a krvou v rovnovážnom stave (Carpenter et al., 2014). Látky s hodnotou $\log BB \geq 0$ sa označujú ako prechodné a naopak, látky s hodnotou $\log BB < 0$ patria medzi neprechodné cez HEB

(Mensch et al., 2010). LogBB sa stanovuje napríklad intravenóznou injekčnou technikou alebo inou *in vivo* metódou (Shityakov et al., 2013), poprípade môže byť vypočítaná *in silico* metódami (Carpenter et al., 2014).

Ďalším parametrom, ktorý charakterizuje pravdepodobnosť prechodu látok cez HEB je permeabilita povrchom plochy (PS produkt, z angl. surface-area product). Tento parameter je oproti logBB viac informatívny, ale technicky náročnejší na meranie kvôli potrebe mikrochirurgickej odbornosti, keďže najčastejšie sa prevádza metódou mozgovej perfúzie. Výhodou je taktiež, že nemusí byť meraný v ustálenom stave. PS produkt je vyjadrený rovnicou:

$$PS = -F * \ln\left(1 - \frac{CL_{in}}{F}\right)$$

kde PS je permeabilita (P) povrchom plochy (S), F je prietok krvi a CL_{in} je permeačná clearance, vyjadrená ako pomer koncentrácie testovanej látky v mozgu ku koncentrácii látky v pretekajúcej krvi za konkrétny čas (Carpenter et al., 2014).

3.3.1 *In vivo* metódy stanovenia prechodnosti látok do centrálnej nervovej sústavy

Na *in vivo* meranie farmakokinetických parametrov, ktoré popisujú transport látok cez HEB boli vyvinuté viaceré metódy (Tab. 1). Najbežnejšou technikou, ktorá vyjadruje vychytávanie látok v mozgu je **intravenózna injekčná technika**. Testovanie prebieha tak, že laboratórnym zvieratám sa intravenózne aplikuje testovaná látka a v stanovovaných časoch sa odoberajú vzorky z arteriálnej krvi, v ktorých sa určí koncentrácia testovanej látky vhodnou analytickou metódou a zostrojí sa závislosť nameraných koncentracii na časoch, kedy bola odoberaná vzorka. Táto metodika taktiež zahŕňa získavanie vzorky z mozgového tkaniva po dekapitácii laboratórneho zvieratá v koncovom časovom bode experimentu, z ktorého sa stanoví koncentrácia testovanej látky v mozgu (Bickel, 2005). Pri tejto metóde sa zisťuje aj objem krvi v mozgových cievach buď premývaním tlmivým roztokom vzostupnej aorty usmrtených zvierat alebo alternatívne sa používa koadministrácia vaskulárnym markerom (napr. rádioaktívne značený albumín). Z nameraných hodnôt sa môže vypočítať CL_{in} alebo PS produkt. CL_{in} je vyjadrený ako:

$$CL_{in} = \frac{(V_D - V_0) * C_p * T}{AUC_0^T}$$

kde V_D predstavuje zdanlivý distribučný objem testovanej látky v mozgu a je vyjadrený ako pomer koncentrácie látky v mozgu ku koncentrácii látky v krvi; V_0 je objem krvi v mozgových cievach; C_p je koncentrácia látky v krvi; T je čas a AUC_0^T je plocha pod krivkou závislosti koncentrácie od času 0 po T (Bickel, 2005).

Index vychytávaníav mozgu využíva injekčnú aplikáciu jednorázovej dávky rádioizotopne značenej testovanej látky a referenčných markerov do krčnej tepny zvierat v anestéze. Používa sa marker, ktorý prechádza do mozgu a taktiež aj marker, ktorý sa do mozgového tkaniva nedostane, aby sa kvôli výpočtu BUI upravila frakcia testovanej látky, ktorá ostáva vo vnútornom priestore cievy v čase odoberania vzorky z mozgu. Po 1 až 2 sekundách sa testovaná látka dostane cez mozgové kapiláry a vychytávanie látok v mozgu je merané ako extrakčná koncentrácia látky z mozgového tkaniva po dekapitácii, ktorá je prevádzaná počas 5 až 15 sekúnd. Krátke časové intervaly zabraňujú systémovej recirkulácii a minimalizujú potenciálne vymývanie vzorky. BUI je vyjadrený nasledujúcou rovnicou:

$$BUI = 100 * (E_{\text{test}} - E_{\text{refv}}) / E_{\text{refp}}$$

kde E_{test} je hodnota extrakčnej koncentrácie testovanej látky z mozgu; E_{refv} je hodnota extrakčnej koncentrácie markeru, ktorý neprechádza do mozgu a E_{refp} je extrakčná koncentrácia markeru prechádzajúceho do mozgu (Oldendorf, 1970).

Krátke časové intervaly potrebné na vzorkovanie pri BUI viedli k vývoju metódy **mozgovej perfúzie**, ktorá predstavuje test prietoku roztoku látky mozgovým tkanivom. Pri tejto technike sa aplikuje perfuzát (stanovovaná látka rozpustená v plazme alebo vo fyziologickom roztoku) do hlavnej cievy, ktorá vedie do mozgu a začne sa perfúzia. Vo vopred určenom čase sa perfúzia zastaví, zviera je dekapitované, odoberie sa vzorka z mozgového tkaniva a následne sa zo vzorky určí množstvo látky v mozgu (Takasato et al., 1984). Najjednoduchší spôsob detekcie je použitie rádioizotopne značenej testovanej látky alebo meranie kvapalinovou chromatografiou/hmotnostnou spektrometriou (LC/MS). Vývoj techniky viedol k zdokonaleniu manipulácie a zloženia perfuzátu, kontroly prietoku krvi a trvania testu (Kuhnlín Sloan et al., 2012).

Ďalšou, v poslednom období často využívanou metódou, je **mikrodialýza**, ktorej princípom je stereotaxická implantácia sondy v anestéze. Sonda sa skladá z krátkych vlákien semipermeabilnej dialyzačnej membrány. V mozgu sa sondou prelieva perfuzát, fyziologický roztok, ktorý má rovnaké zloženie ako extracelulárna tekutina. Látky, ktoré prestupujú do mozgu, difundujú membránou do perfuzátu na základe koncentračného

gradientu a sú kontinuálne odoberané do analyzátora ako dialyzát, z ktorého sa vhodnými analytickými metódami zisťuje koncentrácia (Verdbeck, 2000).

Na meranie metódou **kvantitatívnej autorádiografie** (QAR) sa používajú vzorky s rádioznačeným ^{14}C a sú aplikované intravenózne do testovaných zvierat. Vzorky sú následne v stanovených časových intervaloch odoberané z arteriálnej krvi. Z nameraných rádioaktivít sa stanoví časové závislosti jednotlivých koncentrácií. Mozgová aktivita sa meria z kryoskopicky upravenej vzorky mozgového tkaniva pomocou RTG-žiarenia. Na to, aby sa touto metódou dal stanoviť PS produkt, musí byť separovane zmeraný regionálny prietok krvi (Bickel, 2005).

Medzi **externé detekčné metódy** zaraďujeme jednofotónovú emisnú výpočtovú tomografiu (= single photon computed tomography, SPECT), pozitronovú emisnú tomografiu (= positron emission tomography, PET) a magnetickú rezonanciu (= magnetizing resonance imaging, MRI). Podstatou externých detekčných metód je, že látky, u ktorých sa zisťuje prechod cez HEB, sú značené rádionuklidom a následne intravenózne aplikované. Po aplikácii sa meria emitované žiarenie látky značenej rádionuklidom a na znázornenie distribúcie látok v mozgu sa používa počítačový software (Kuhnlín Sloan et al., 2012). MRI a PET metódou je v rámci kvantitatívnych meraní možné zistiť PS produkt testovaných látok. Dynamické MRI merania sledujú zmeny koncentrácie kontrastnej látky v mozgovom tkanive po intravenózne aplikácii bolusu sledovanej látky. Dynamické PET merania PS produktu využívajú skenovacie postupy a tiež je potrebné mať informácie o funkcii arteriálneho vstupu, ktoré sa zisťujú buď odoberaním vzoriek z krvi alebo skenovaním veľkých ciev. Výsledky sa vyhodnocujú graficky alebo s využitím kompartmentových farmakokinetických modelov (Bickel, 2005).

Tab. 1 Výhody a nevýhody in vivo metód používaných na meranie transportu látok HEB (Bickel, 2005; Kuhnlín Sloan et al., 2012).

Metóda	Výhody	Nevýhody
Intravenózna injekčná technika	<ul style="list-style-type: none"> – neovplyvňuje fyziologické a metabolické pochody organizmu, vysoká senzitivita – nízka technická náročnosť 	<ul style="list-style-type: none"> – vyžaduje citlivé analytické metódy – potreba veľkého množstva zvierat na získanie relevantného štatistického vyhodnotenia

BUI	<ul style="list-style-type: none"> – rýchla metóda – možnosť modifikácie v zložení aplikovanej vzorky (koncentrácia testovanej látky, elektrolytov, pH, osmotický tlak) – vylúčenie vplyvu vedľajších produktov metabolizmu 	<ul style="list-style-type: none"> – relatívne málo senzitívna – krátke časy merania, teda je znemožnené meranie procesov s pomalým vychytávaním v mozgu
Metóda mozgovej perfúzie	<ul style="list-style-type: none"> – vzorka je priamo aplikovaná do ciev vedúcej do mozgu – do aplikovaného perfuzátu sa dajú pridať inhibítory enzýmov, efluxné transportéry, čo ponúka možnosť štúdia transportu a metabolizmu látok a taktiež je možné ovplyvniť krvný prietok – vyššia senzitivita ako pri BUI 	<ul style="list-style-type: none"> – nešpecifická absorpcia liečiv na mozgové tkanivo – potreba veľkého množstva zvierat na získanie relevantného štatistického vyhodnotenia – technicky náročnejšia technika
Mikrodialýza	<ul style="list-style-type: none"> – menej usmrtených zvierat – možné dlhodobé štúdium s minimálnym narušením fyziologických funkcií organizmu – meraná je len voľná frakcia testovaných látok – umožnenie pravidelného a opakovaného merania a odoberané vzorky sú vhodné na analytické meranie 	<ul style="list-style-type: none"> – pri dlhodobej implantácii sondy hrozí riziko rozvinutia imunitnej reakcie a následná fibróza tkaniva – narušenie integrity HEB implantovanou sondou
QAR	<ul style="list-style-type: none"> – vysoké priestorové rozlíšenie 	<ul style="list-style-type: none"> – časová náročnosť – nedajú sa rozlíšiť pôvodné látky od metabolitov, ani viazaná forma látky na bielkoviny od neviazanej

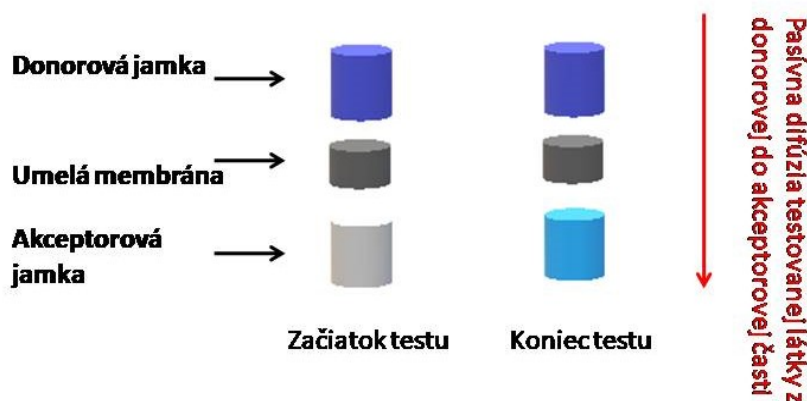
		– použitie veľkého počtu testovaných zvierat
Externé detekčné metódy (SPECT, PET, MRI)	– neinvazívne rýchle metódy – meranie časovej závislosti na individuálnych subjektoch	– nákladnosť prístrojov a používaných indikátorov – nutnosť syntézy indikátorov tesne pred aplikáciou, kvôli krátkemu času rozpadu

3.3.2 Stanovenie prechodu látok do mozgu *in vitro* a *in silico* metódami

Keďže *in vivo* metódy na stanovenie prechodnosti látok cez HEB sú náročné, či už z časového, materiálneho, technického alebo cenového hľadiska, boli vyvinuté menej náročné *in vitro* a *in silico* metódy, medzi ktoré patria metódy založené na bunkových kultúrach, metóda imobilizovanej umelej membrány (= immobilized artificial membrane, IAM), test paralelného membránového prenikania (= parallel artificial permeability assay, PAMPA), kvantitatívny vzťah štruktúra-aktivita (= quantitative structure-activity relationship, QSAR), molekulárna dynamika (= molecular dynamics, MD) a metóda simulácie voľnej energie.

3.3.2.1 Test paralelného membránového prenikania

PAMPA patrí medzi metódy využívajúce umelé membrány na stanovenie predpokladu pasívnej transcelulárnej difúzie cez biologické bariéry. Hlavnou výhodou tejto metódy je jej vysoká výkonnosť, nízke náklady, reproduktibilita a použitie malého množstva vzorky. Samotný test je založený na prechode látok z donorovej do akceptorovej časti cez membránový filter naplnený lipidovým roztokom. Schématicky je test znázornený na Obr.3. Donorovú časť predstavuje 96-jamková platňa naplnená roztokom stanovovanej látky v tlmivom roztoku. Akceptorovú časť tvorí 96-jamková platňa naplnená čistým tlmivým roztokom. V stanovených časových intervaloch sa odoberajú vzorky z akceptorovej aj donorovej platne a určujú sa koncentrácie v oboch kompartmentoch. Na stanovenie koncentrácie sa môže využívať LC/MS alebo spektrofotometria v ultrafialovej/viditeľnej oblasti (UV/VIS) (Schmidt, Lynch; 2003). Následne sa z nameraných hodnôt vypočíta P_e (permeačný koeficient), na základe ktorého sa posudzuje prechodnosť látok cez HEB (Di et al., 2003).



Obr. 3 Schématické znázornenie priebehu PAMPA testu.
(Modifikované podľa: Schmidt et al., 2003).

Prvé použitie metódy PAMPA bolo v súvislosti s určením orálnej absorpcie liečiv z gastrointestinálneho traktu (GIT). Široké využitie metódy viedlo k jej modifikácii na stanovenie pravdepodobnosti prechodu aj inými bariérami, konkrétne kožnou, ktorú navrhol G. Ottaviani (Ottaviani et al., 2006) a HEB, prvýkrát predstavenú L. Di (Di et al., 2003). Modifikácia metódy na stanovenie pravdepodobnosti prechodu cez HEB (PAMPA-HEB) oproti určeniu absorpcie z GIT (PAMPA-GIT) spočíva v zložení lipidov používaných ako umelá membrána a v nastavení hodnôt pH. PAMPA-GIT využíva membránový lipid (PML, fosfatidylcholín v dodekáne). PAMPA-HEB používa polárny mozgový lipid (= polar brain lipid, PBL), ktorého zloženie je popísané v Tab.2. Dôvodom zmeny v zložení lipidu je, že pri použití PML pri PAMPA-HEB bol malý rozdiel v meraných hodnotách medzi látkami s vysokou a nízkou pravdepodobnou permeabilitou (Di et al., 2003). V rámci dosiahnutia čo najpresnejších výsledkov je dôležitá taktiež koncentrácia a objem používaného PBL. Najvhodnejším je objem PBL 4 μL a koncentrácia 22 mg/mL (pre zjednodušenie testovania sa používa 20 mg/mL a rozpúšťa sa v dodekáne). Rozdielnosť metód v meraní pri iných hodnotách pH je daná tým, že pri PAMPA-GIT sa meria pravdepodobná prechodnosť pri niekoľkých rôznych hodnotách pH, ktoré napodobňujú fyziologické podmienky GIT, zatiaľ čo vzhľadom na konštantné pH krvi 7,4 je u PAMPA-HEB meraná pravdepodobná prechodnosť len pri tejto hodnote (Di et al., 2003).

Tab. 2 Zloženie polárne mozgového lipidu.
(Modifikované podľa: Di et al., 2003).

Zložka	Obsah (%)
Fosfatidyletanolamín	33,1
Fofatidylserín	18,5
Fosfatidylserín	12,6
Fosfatidylcholín	0,8
Fosfatidová kyselina	4,1
Ostatné (cerebrozidy, sulfatidy, pigmenty)	30,9

Nevýhodou používania metódy PAMPA je, že nie u všetkých látok sa dá touto metódou určiť pravdepodobnosť prechodu. Keďže PAMPA predstavuje pasívny transport, problémom sú látky, ktoré môžu byť transportované HEB aktívne (influxom alebo efluxom) alebo sú HEB metabolizované. Príkladom je kofeín, ktorý je metódou PAMPA určený ako pravdepodobne neprechodný, ale keďže je transportovaný aj pasívnou difúziou a taktiež aj aktívnym influxom, je tento výsledok falošne negatívny. Naopak, falošne pozitívny výsledok poskytuje napríklad kortikosterón, ktorý je substrátom P-glykoproteínu a je teda transportovaný z mozgu aktívnym efluxom (Di et al., 2003).

Riešením tohto problému je skombinovať metódu PAMPA s meraním prechodu na Caco-2 bunkových kultúrach, ktoré poskytujú informácie aj o aktívnom transporte látok. Caco-2 bunková línia bola pôvodne získaná z diferencovaných buniek ľudského kolonálneho adenokarcinómu a používaná na *in vitro* testovanie perorálnej absorpcie. Z Caco-2 buniek sa pripravuje bunková monovrstva, ktorá reprezentuje HEB a testuje sa cez ňu transport látok, ktorý je vyjadrený ako *Pe* (Masungi et al., 2008). Výsledky sú porovnávané s PAMPA meraniami. Ak tieto výsledky korelujú, testovaná látka je transportovaná do CNS pasívnou difúziou. Ak je *Pe* získaný metódou PAMPA vyšší ako pri meraní na Caco-2 bunkách, testovaná látka podlieha aktívnemu efluxu a vyššie hodnoty *Pe* pri testovaní na Caco-2 bunkách svedčia o aktívnom influxe látok (Kerns et al., 2004). Namiesto Caco-2 bunkových kultúr, môžu byť použité aj iné bunkové línie,

ako napríklad adherentná bunková línia získaná z obličiek psa (Madin-Darby canine kidney, MDCK) (Liu et al., 2012).

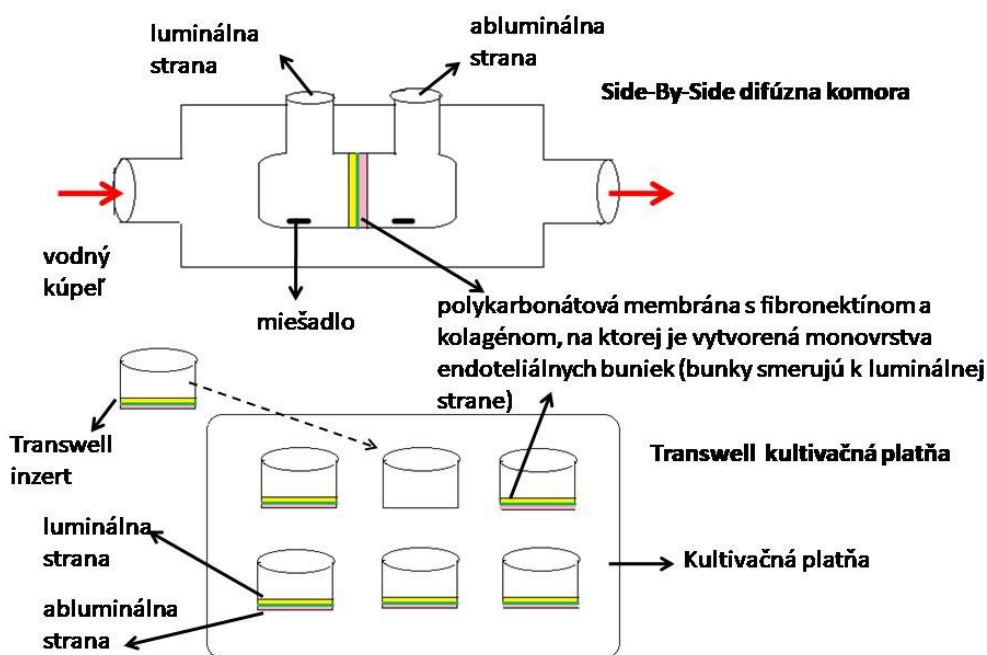
3.3.2.2 Ostatné *in vitro* a *in silico* metódy na stanovenie prechodu látok cez hematoencefalickú bariéru

Ďalšou metódou na zistenie pravdepodobného prechodu látky cez HEB je IAM technika, patriaca podobne ako PAMPA medzi metódy využívajúce umelé membrány (Faller, 2008). IAM napodobňuje fosfolipidové prostredie HEB tak, že sa syntetizujú lipidové analógy, z ktorých sa vytvorí jednovrstvová membrána a použije sa ako materiál do kolóny pre vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu (HPLC), kde sa merajú testované látky. Získané IAM chromatografické retenčné faktory sa použijú na vyhodnotenie pravdepodobnosti prechodu látok cez HEB (Carpenter et al., 2014).

Často využívané sú aj metódy prevádzané na bunkových kultúrach. Používajú sa primárne kultúry endoteliálnych buniek izolovaných zo šedej hmoty mozgu hovädzieho dobytku alebo prasat'a (bovine brain microvessel endothelial cell= BBMEC, porcine brain microvessel endothelial cell= PBMEC). Výhodou týchto metód je, že na bunkách môžu byť exprimované efluxné transportéry aj špecifické systémy vychytávajúce látky do mozgu, takže je sledovaný pasívny aj aktívny transport (Kuhnline Sloan et al., 2012). Na testovanie sa využívajú buď horizontálne alebo vertikálne systémy bunkových línií. Jednoduchším z hľadiska prevedenia sú vertikálne systémy, medzi ktoré zaraďujeme Transwell inzertný systém. Bunky rastú na vrstve kolagénu a fibronektínu na polykarbonátovom filtri, ktorý je vyberateľný a vkladá sa do kultivačnej platne. Filter oddeľuje hornú (donorovú) a dolnú (akceptorovú) časť. Nevýhodou tohto systému je, že sa ťažko kontroluje teplota, nie je garantované dobré miešanie a taktiež je v závislosti na konštrukcii vytvorený nežiadúci hydrostatický tlakový gradient. Tieto nedostatky rieši umiestnenie filtra horizontálne, ako je to u Side-By-Side systému, kde sa využíva miešadlo, aby bolo zabezpečená homogenizácia testovanej vzorky. Teplotná stabilita je vytvorená použitím cirkulujúceho vodného kúpeľa. Schématické znázornenie systémov sa nachádza na Obr. 3. Samotný experiment prebieha tak, že sa do donorovej časti pridávajú testované látky a v stanovených časových intervaloch sa odoberajú vzorky z donorovej aj akceptorovej časti a stanoví sa v nich koncentrácie testovanej látky (C_{donor} a C_{akceptor}). Použitím známych objemov (V_{donor} a V_{akceptor}) sa stanoví prírastkový objem, v každom časovom bode (ΔV_{CL}):

$$\Delta V_{CL} = \frac{C_{akceptor} * V_{akceptor}}{C_{donor}}$$

Ak je koncentrácia v akceptorovej časti malá a ΔV_{CL} rastie lineárne, krivka závislosti môže byť interpretovaná ako PS produkt. Keďže poznáme plochu filtru S, permeabilita P bude vyjadrená ako pomer PS produktu k S (Bickel, 2005).



Obr. 4 Schématické znázornenie merania prechodnosti látok cez HEB Transwell inzertným systémom a Side-By-Side systémom.
(Modifikované podľa: Kuhnline Sloan et al., 2012).

Pravdepodobná permeabilita testovaných látok do mozgu, vyjadrená logBB, sa okrem testovania *in vivo* dá stanoviť aj vypočítaním pomocou počítačových systémov. QSAR modely predpokladajú, že biologická aktivita je založená na interakciách, ktoré látky podstupujú počas prechodu HEB. Tieto interakcie závisia od štruktúry a vlastností látok, označené ako deskriptory, s ktorými počíta matematický počítačový systém a vyhodnocuje z nich logBB. Ďalšou významnou *in silico* metódou je MD, ktorá simuluje molekulárne procesy, ako je napríklad difúzia na atomárnej úrovni. Spolu s technikou stanovenia voľnej energie dokážu detailne popísať prechod látok do mozgu (Carpenter et al., 2014).

4 Cieľ práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo:

- určiť pravdepodobnosť prechodu takrín-tiachinazolínových a takrín-benzotiazolových derivátov cez HEB využitím metódy PAMPA;
- výpočet permeačného koeficientu Pe testovaných látok a porovnanie získaných hodnôt s Pe štandardných látok, u ktorých je známy prechod cez HEB;
- stanovenie cytotoxicity študovaných takrínových derivátov využitím MTT-testu a porovnanie výsledkov so štandardnými látkami;

5 Experimentálna časť

5.1 Použité chemikálie

Dimethylsulfoxid (DMSO), dodekán, fosfátový tlmivý roztok (Dulbecco's phosphate buffer saline= PBS; pH= 7.4), metylénová tetrazolyová soľ (3-[4,5-dimetyltiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazóliumbromid= MTT), médium F-12 Ham (Nutrient mixture F-12 Ham), fetálne hovädzie sérum (10% FBS, teplom aktivované), trypsín/EDTA (2,5%) a penicilín (10 000 U)/ streptomycín (10 mg/ml) boli zakúpené od firmy Sigma Aldrich (USA). PBL bol dodaný od firmy Avanti (USA).

Donepezil hydrochlorid monohydrát, furosemid, ibuprofen, ranitidín, rivastigmín tartrát, sulfasalazín boli zakúpené od firmy Sigma Aldrich (Česká republika) a boli použité ako štandardné látky.

5.2 Použitá bunková línia

Chinese hamster ovary cell line (CHO-K1; ATCC[®] CCL-61[™]) – adherentné epiteliálne bunky z karcinómu vaječníka čínskeho škrečka (*Cricetulus griseus*) boli po zakúpení uskladnené v tekutom dusíku a následne kultivované v médiu F-12 Ham s prídavkom 10% FBS a 1% roztoku antibiotík (penicilín (10 000 U)/ streptomycín (10 mg/mL)) v inkubátore pri teplote 37 °C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti.

5.3 Použité prístroje

Analytické váhy CPA225 - Sartorius, Stedim Biotech

Centrifúga Universal 320R - Hettich, Schoeller

Laminárny box - Bioair, BioTech

Spektrofotometer – multidetekčný reader, Synergy HT, BioTek

Termostat – Thermo Scientific

Vodný kúpeľ - PolyScience

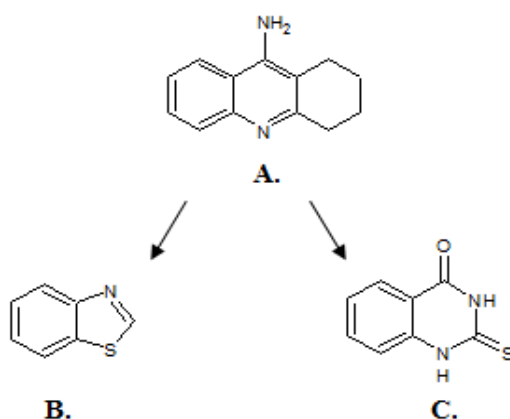
VortexMixer- Wizard Advanced IR, Velp Scientifica

Ultrazvukový kúpeľ - Elmasonic P, Elma

5.4 Testované látky

Testované látky patria medzi takrínové deriváty, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú takrín (Obr.5A) napojený spájacím reťazcom s benzotiazolom (Obr.5B) alebo tiachinazolínom (Obr.5C). Na základe chemickej štruktúry boli rozdelené do dvoch

skupín, na takrín-benzotiazolové deriváty (označenie **A-D**) a takrín-tiachinazolínové deriváty (označenie **1-5**). Deriváty **A-D** boli syntetizované v Centre biomedicínskeho výskumu, Fakultná nemocnica Hradec Králové. Deriváty **1-5** boli taktiež syntetizované v Centre biomedicínskeho výskumu, Fakultná nemocnice Hradec Králové v spolupráci s Univerzitou Boloňa. Z dôvodu možného publikovania alebo patentovania syntézy nie sú v diplomovej práci uvedené chemické štruktúry testovaných látok. V Tab. 3 a 4 je k daným látkam priradená molekulová hmotnosť (Mw) a ich rozdeľovací koeficient oktanol/voda (log P). Hodnoty log P boli zistené použitím freewaru MarwinSketch.



Obr. 5 Štruktúrne vzorce: A. takrín, B. benzotiazol a C.tiachinazolín.

Tab. 3 Chemické charakteristiky testovaných takrín-tiachinazolínových derivátov 1-5.

Označenie látky	Mw [g/mol]	log P
1	543,5	7,78
2	545,0	7,47
3	569,1	6,86
4	527,0	7,32
5	553,1	6,80

Tab. 4 Chemické charakteristiky testovaných takrín-benzotiazolových derivátov A-D.

Označenie látky	Mw [g/mol]	log P
A	493,8	6,30
B	504,4	5,63
C	489,4	5,54
D	473,4	6,21

5.5 Metódy práce

5.5.1 Príprava roztokov testovaných látok na meranie

Navážením určitého množstva testovaných látok **1-5**, **A-D** a štandardných látok (podľa Mw, potrebného objemu a koncentrácie k testovaniu) boli pripravené ich zásobné roztoky v DMSO. Kvôli dobrému rozpusteniu boli roztoky premiešané na vortexe a taktiež vložené do ultrazvukového kúpeľa (10 min., 30 °C).

Na meranie metódou PAMPA (viď. kapitola 5.6.2) boli následne roztoky testovaných látok **1-5**, **A-D** a štandardných látok rozpustené v PBS (celkový objem 11 mL) tak, aby koncentrácia DMSO nepresiahla v meranom roztoku 0,5%. Všetky testované látky boli merané pri koncentrácii 0-50 μM .

Na meranie metódou MTT (viď. kapitola 5.6.4) boli roztoky testovaných látok rozpustené v kultivačnom médiu (celkový objem 2 mL) taktiež tak, aby koncentrácia DMSO nepresiahla 0,5%. Látky boli testované pri nasledujúcich koncentráciách: **A-D**, **1**, **4**, **5** pri 0-200 μM , **2** a **3** pri 0-250 μM .

5.5.2 Test paralelného membránového prenikania

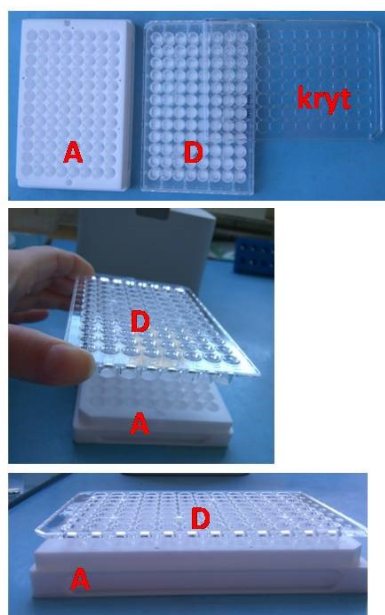
5.5.2.1 Zostrojenie kalibračnej krivky

Roztoky testovaných látok boli pripravené podľa kapitoly 5.6.1 a použitím spektrofotometra boli premerané ich absorpčné spektrá v oblasti 200 – 700 nm, z ktorých bolo určené absorpčné maximum potrebné pre ďalšie merania. Následne boli pre každú testovanú látku v mikroskúmavkách pripravené roztoky pre vytvorenie kalibračnej rady obsahujúcej 5 bodov v danom koncentračnom rozsahu. Dané roztoky boli napipetované

v triplikátoch na 96-jamkovú mikrotitračnú platňu a premerané pri vlnovej dĺžke absorpčného maxima. Získané údaje boli použité na zostrojenie kalibračnej krivky, vypočítanie hodnoty spoľahlivosti (R^2) a určenie rovnice linearity. Kalibračná krivka je chápaná ako priamková závislosť medzi nameranou absorbanciou a koncentráciou meraných roztokov látky (Schmidt, Lynch; 2003).

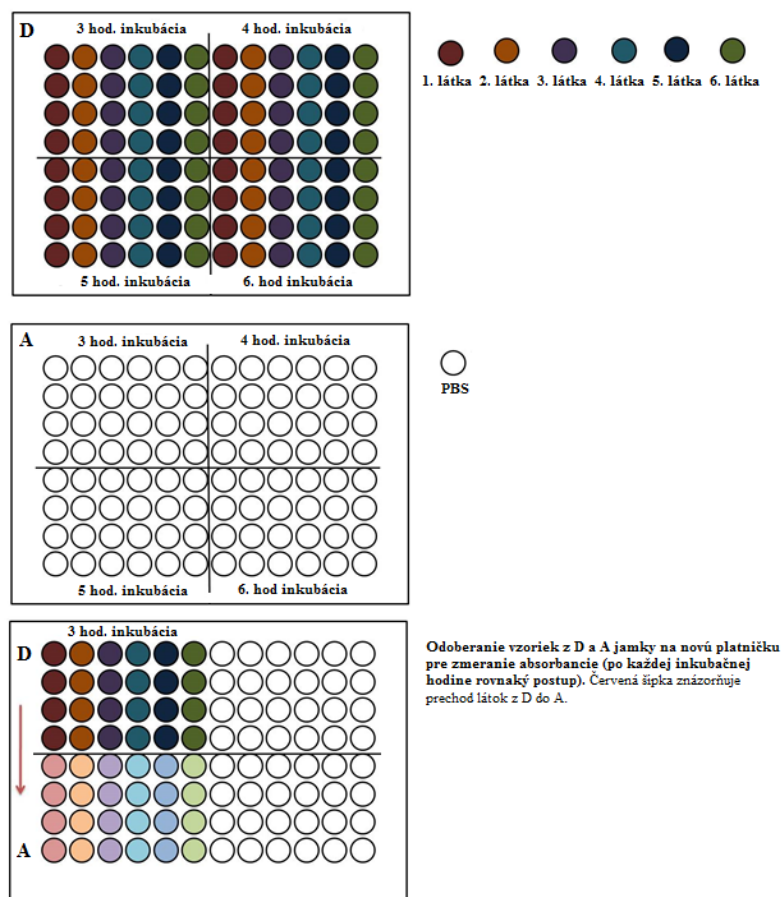
5.5.2.2 *Predpoklad prechodu látok cez hematoencefalickú bariéru*

Predpoklad prestupu testovaných látok cez HEB bol študovaný použitím metódy PAMPA. Roztoky testovaných látok **1-5**, **A-D** a štandardných látok v PBS (pripravené podľa kapitoly 5.6.1) boli inkubované 18 hod pri laboratórnej teplote. Po inkubácii boli roztoky pripravených látok skontrolované kvôli možnému vyzrážaniu a v prípade potreby vložené do vodného alebo ultrazvukového kúpeľa (10 min., 37 °C). Na meranie metódou PAMPA bola nachystaná aparátúra (Obr. 6) zložená z 96-jamkovej donorovej a 96-jamkovej akceptorovej platne. Schéma práce je znázornená na Obr.7.



Obr. 6 Aparatúra na meranie PAMP-y.

Označenie: A= 96-jamková akceptorová platňa, D= 96-jamková donorová platňa.



Obr. 7 Schéma práce PAMP-y.

Označenie: A= 96-jamková akceptorová platňa, D= 96-jamková donorová platňa.

Postupovali sme nasledovne:

- do donorovej platne, ktorá obsahuje polyvinylidén fluoridový (PVDF) membránový filter, boli nanosené 4 μL BPL (rozpustený v dodekáne o koncentrácii 20 mg/mL);
- akceptorová polytetraflóretylénová (PTFE) platňa bola naplnená samotným PBS (pH = 7,4; 300 μL , V_a);
- do jamiek donorovej platne bolo napipetovaných 300 μL testovanej látky (V_d) v štyroch replikátoch pre štyri časové intervaly následnej inkubácie. Látky 1, 2, 4 a 5 boli testované pri 30 a 50 μM látka 3, A-D pri 50 μM ;
- donorová platňa bola opatrne položená na akceptorovú;
- aparátúra bola položená do tmy a ponechaná na inkubáciu pri laboratórnej teplote. Bol zaznamenaný čas. Testované látky difundujú z donorovej jamky cez lipidovú membránu o ploche 0,28 cm^2 do akceptorovej jamky;

- koncentrácia danej látky v donorovej a akceptorovej jamke bola hodnotená po 3, 4, 5 a 6 hod inkubácie meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke absorpčného maxima danej látky použitím spektrofotometra;
- taktiež boli pripravené roztoky daných látok s tzv. teoretickou koncentráciou, pri ktorej sa predpokladá spojenie roztokov z donorovej a akceptorovej jamky (teoretická rovnováha, equilibrium);
- koncentrácie látok v donorovej a akceptorovej jamke a taktiež teoretická koncentrácia boli vypočítané použitím rovnice regresie získanej z kalibračných kriviek;
- následne boli vypočítané hodnoty permeačného koeficientu Pe pre každý časový bod a z aritmetického priemeru kvadruplikátu bola stanovená jeho výsledná hodnota, na základe ktorej bol určený predpoklad prechodnosti látky cez HEB (Di et al., 2003);
- počas celého experimentu bola kontrolne premeriavaná aj koncentrácia zásobných roztokov testovaných látok (100 μ M), čím bola sledovaná ich stabilita a prípadné zrážanie v rozpúšťadle.

Výpočet Pe bol uskutočnený podľa rovnice (Müller et al., 2015):

$$\log Pe = \log \left[C \times -\ln \left(1 - \frac{[látka]_{akceptor}}{[látka]_{equilibrium}} \right) \right]$$

$$C = \frac{V_d \times V_a}{(V_d + V_a) \times a \times t}$$

kde V_d je objem v donorovej jamke (300 μ L), V_a je objem v akceptorovej jamke (300 μ L), a je plocha jamky (0.28 cm²), t je čas merania v sekundách, $[látka]_{akceptor}$ je koncentrácia látky v akceptorovej jamke a $[látka]_{equilibrium}$ je koncentrácia látky v teoretickej rovnováhe.

5.5.3 Kultivácia adherentných buniek

Kultivácia adherentných buniek CHO-K1 prebiehala pravidelne trikrát za týždeň (podľa rastu buniek), pričom bunkám bolo vždy vymieňané čerstvé médium a inverzným mikroskopom bola kontrolovaná ich viabilita a stupeň konfluencie. Postupovali sme nasledovne:

- z kultivačnej fľaše bolo odstránené staré médium;
- vrstva buniek bola premytá použitím 5 mL PBS;

- na premytú vrstvu buniek bol napipetovaný 1 mL trypsínu tak, aby pokryl celú plochu kultivačnej nádoby. Následne bola kultivačná fľaša položená do inkubátora na 5 min, aby sa bunky odlepili od povrchu;
- potom boli bunky rozsuspendované v 5 mL čerstvého média;
- z tejto suspenzie bolo odobraných 200 μ L a zriedených v 1,8 mL kultivačného média. Z daného roztoku bola časť odobraná na Bürkerovu komôrku a bol stanovený počet buniek;
- potrebný počet buniek bol prenesený naspäť do kultivačnej fľaše a bolo doplnených 10 mL čerstvého média;
- v prípade experimentu bol potrebný počet buniek nasadený na 96-jamkovú platničku a ponechaný na inkubáciu 24 hod;
- bunky boli inkubované v termostate pri teplote 37 °C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti.

5.5.4 MTT test

MTT test je kolorimetrická metóda určená na meranie cytotoxicity testovaných látok na základe zmien v metabolickej aktivite buniek. Postupovali sme nasledovne:

- roztoky testovaných látok boli pripravené podľa kapitoly 5.6.1;
- CHO-K1 bunky (8000 b./100 μ L) boli inkubované bez (kontrolná skupina) a s pridaním testovaných látok **1-5**, **A-D** a štandardných látok (koncentrácia látok **A-D**, **1**, **4**, **5**: 0-200 μ M, **2** a **3**: 0-250 μ M) na 96-jamkových platniach 24 hod, pri 37 °C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti;
- 100 μ L testovaných látok pripravených v kultivačnom médiu bolo pipetovaných na 96-jamkové platne zostupne od najvyššej koncentrácie v triplikátoch;
- po 24 hod bolo z platne odstránené staré médium. Následne bolo k vzorkám pridané MTT (rozpustené v kultivačnom médiu o koncentrácii 0,5 mg/mL) a prebehla ďalšia 3-4 hod inkubácia.
- metabolizácia bola zastavená pridaním DMSO, ktorý spôsobil rozpustenie vznikajúceho formazánu, ktorého absorbancia bola premeraná pri dvoch vlnových dĺžkach (570 a 650 nm) použitím spektrofotometra Synergy HT.
- výsledky boli vyhodnotené ako *IC*₅₀ z kontrolných triplikátov v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou a taktiež bolo zo získaných

hodnôt odčítané pozadie kultivačného média. Hodnoty IC_{50} boli vypočítané použitím nelineárnej regresie (4 parametre) v GraphPad Prism 7.

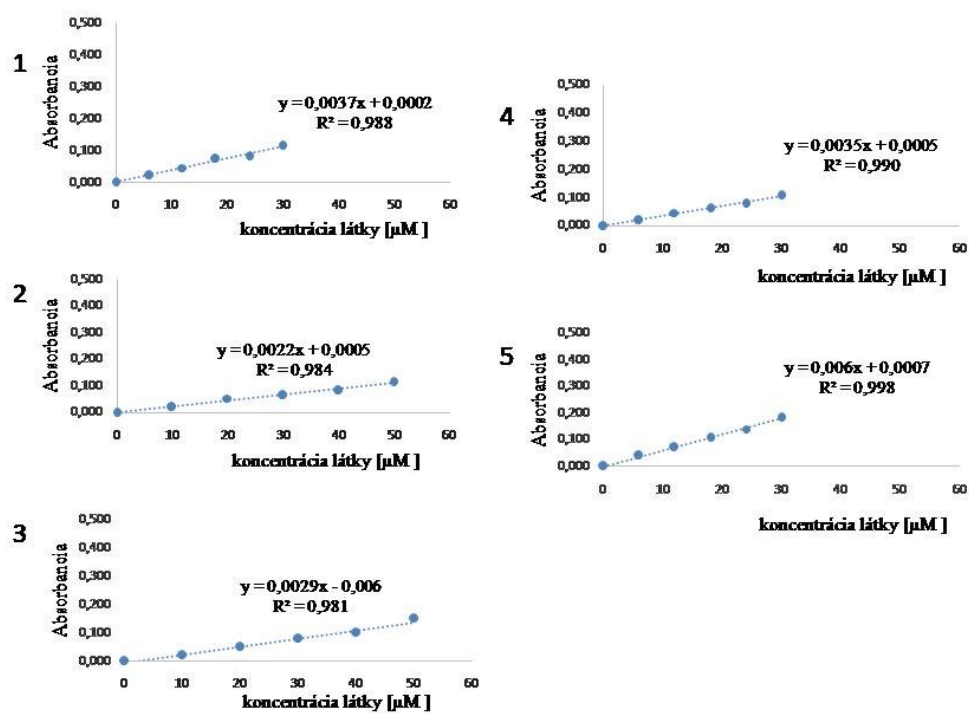
5.6.5 Analýza dát

Získané namerané súbory dát v kontrolných a experimentálnych skupinách boli analyzované použitím programu Excel (pri metóde PAMPA) a GraphPad Prism 7 (pri MTT-teste), kedy bol vypočítaný aritmetický priemer a smerodajná odchýlka (SD) z najmenej 3 nezávislých meraní ($n= 3-4$). Hodnoty v tabuľkách sú uvedené ako aritmetický priemer \pm SD.

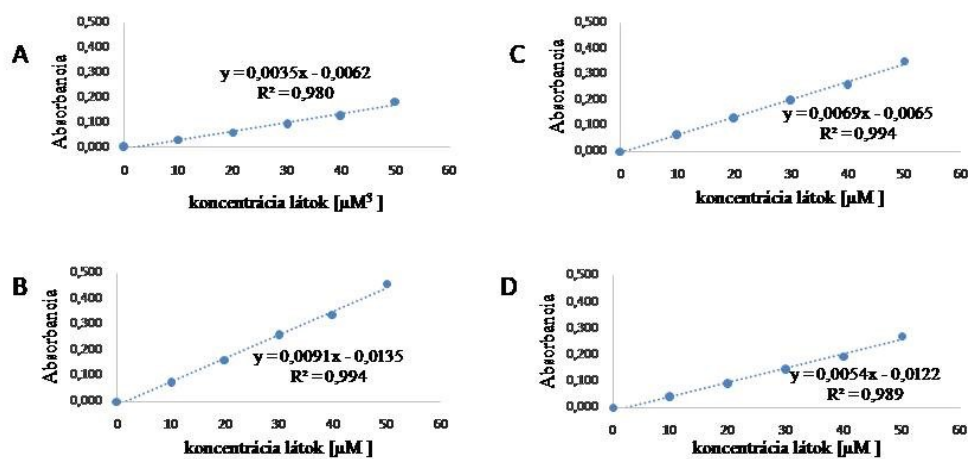
6 Výsledky

6.1 Test paralelného membránového prenikania

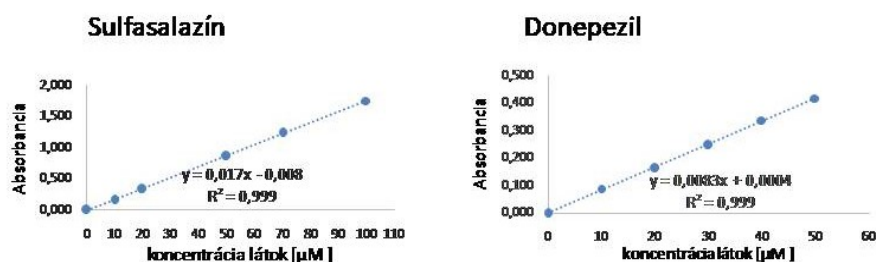
Predpoklad schopnosti testovaných látok prechádzať cez HEB bol meraný metódou PAMPA. Najprv boli z pripravených kalibračných rád pre každú testovanú látku zostrojené kalibračné krivky a stanovené rovnice linearity potrebné k výpočtu koncentrácie látok v donorovej a akceptorovej jamke a taktiež teoretickej koncentrácie. Na Obr. 8 sú znázornené kalibračné krivky pre takrín-tiachinazolínové deriváty **1-5** a na Obr. 9 pre takrín-benzotiazolové deriváty **A-D**. Následne boli pre všetky testované látky vypočítané permeačné koeficienty P_e , na základe hodnôt ktorých bola stanovená ich predpokladaná permeabilita cez umelú lipofilnú membránu. Vypočítaná hodnota P_e pre testovanú látku vždy vychádzala zo štyroch časových intervalov premeriavaných v kvadruplikátoch, ktoré boli spriemerované v rámci jedného merania. Výsledná hodnota P_e so smerodajnou odchýlkou bola stanovená vždy z 3 – 4 meraní. Jednotlivé hodnoty P_e sú uvedené v Tab. 5. Pri PAMPA meraniach boli taktiež testované štandardné látky ibuprofen, donepezil a rivastigmín, u ktorých je známe, že cez HEB prechádzajú z už uskutočnených *in vivo* experimentov (Carpenter et al., 2014; Wang et al., 2014). Štandardné látky furosemid, ranitidín a sulfasalazín boli použité ako negatívne kontroly, u ktorých prechod cez HEB nebol potvrdený (Bicker et al., 2016; Ooms et al., 2002). Na Obr.10 sú znázornené kalibračné krivky štandardov donepezilu a sulfasalazínu. Počas experimentu bola taktiež sledovaná závislosť koncentrácie látok v donorových a akceptorových jamkách aparatury na čas. Príklady týchto závislostí pre takrín-benzotiazolový derivát **C** a takrín tiachinazolínového derivátu **5** sú znázornené na Obr. 11. Ako c donor sú označené koncentrácie látok v donorových a c akceptor v akceptorových jamkách aparatury PAMPA.



Obr. 8 Kalibračné krivky takrín-tiachinazolínových derivátov 1-5.



Obr. 9 Kalibračné krivky takrín-benzotiazolových derivátov A-D.



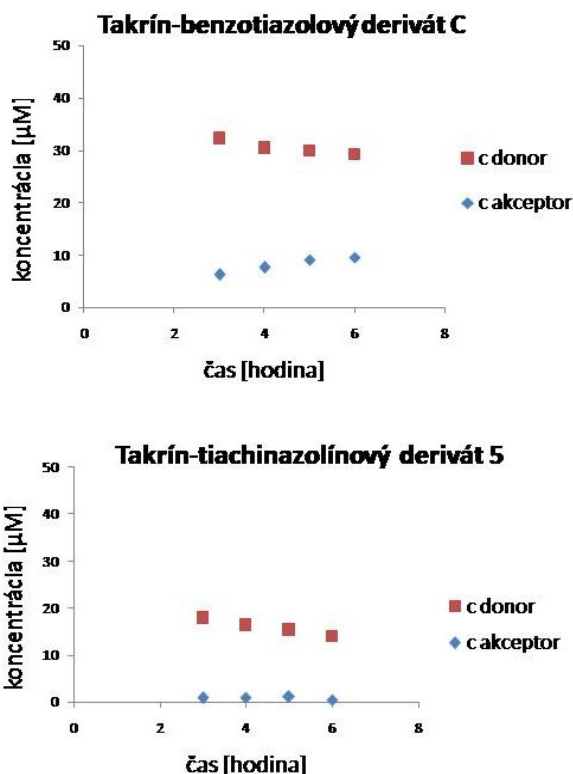
Obr. 10 Kalibračné krivky sulfasalazínu a donepezilu.

Tab. 5 Predpoklad prechodu testovaných látok A-D a 1-5 a štandardných látok cez HEB.

Látka	N	$Pe \pm SD$ [$\times 10^{-6}$ cm/s]	CNS (+/-)
A	5	$13,7 \pm 6,01$	CNS (+)
B	3	$8,31 \pm 2,86$	CNS (+)
C	3	$16,9 \pm 1,61$	CNS (+)
D	3	$13,7 \pm 1,81$	CNS (+)
1	4	$8,59 \pm 0,73$	CNS (+)
2	4	$3,79 \pm 2,41$	CNS (+/-)
3	4	$10,9 \pm 6,65$	CNS (+)
4	4	$14,9 \pm 0,66$	CNS (+)
5	4	$2,00 \pm 0,72$	CNS (-)
Takrín	3	$5,94 \pm 1,79$	CNS (+)
Benzotiazol	3	$20,08 \pm 0,65$	CNS (+)
Ibuprofen	3	$15,38 \pm 5,49$	CNS (+)
Donepezil	3	$21,93 \pm 5,04$	CNS (+)
Rivastigmín	3	$18,69 \pm 4,06$	CNS (+)
Sulfasalazín	3	$0,09 \pm 0,08$	CNS (-)
Ranitidín	3	$0,04 \pm 0,03$	CNS (-)
Furosemid	3	$0,13 \pm 0,09$	CNS (-)

Poznámka: n = počet meraní.

Ak $Pe \geq 4,0 \times 10^{-6}$ cm/s - CNS (+); ak $Pe \leq 2,0 \times 10^{-6}$ cm/s - CNS (-); ak $Pe = 2,0 - 4,0 \times 10^{-6}$ cm/s - CNS (+/-).

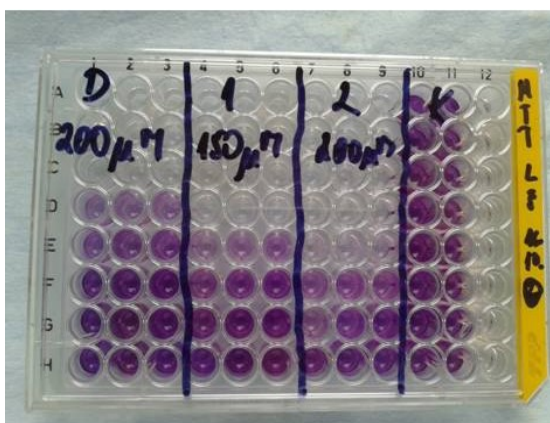


Obr. 11 Vyhodnotenie PAMPA: Grafy závislosti koncentrácie testovaných látok na čase v donorovej a akceptorovej časti aparátúry PAMPA.

6.2 MTT-test

Účinok testovaných látok na metabolickú aktivitu buniek CHO-K1 bol stanovený MTT-testom, ktorý patrí medzi bežne využívané metódy pre určenie *in vitro* toxicity. Metóda je založená na schopnosti živých buniek redukovať žltý solubilný MTT na nerozpustný modrý formazán (modré kryštály hviezdovitého tvaru). Reakcia prebieha na mitochondriálnej membráne živých buniek. Kryštály sa rozpustia pridaním DMSO a výsledky sa vyhodnocujú spektrofotometricky. Hodnota absorbancie roztoku odpovedá množstvu živých buniek (čím tmavšia farba, tým viac živých buniek) (Stockert et al., 2018).

Na Obr. 12 je demonštratívne znázornená 96-jamková mikrotitračná platňa, ktorá sa vyhodnocuje v rámci MTT-testu. Konkrétne v tomto prípade boli testované látky **D** (200 μM), **1** (150 μM) a **2** (200 μM). K bunkám CHO-K1 boli pridané testované látky v triplikátoch v ôsmich koncentráciách, ktoré boli dosiahnuté dvojkovým riedením (zhora od najvyššej po najnižšiu koncentráciu). Po pridaní MTT a DMSO bola sledovaná životaschopnosť buniek v prítomnosti daných testovaných látok. Premeriavaná bola aj kontrolná skupina (bunky bez prídavku látok) a samotné médium (bez buniek a bez prídavku látok).



Obr. 12 Výsledok MTT-testu látok D, 1 a 2.

Výsledky MTT-testu boli vyhodnotené ako IC_{50} (polovica maximálnej inhibičnej koncentrácie – koncentrácia, pri ktorej je usmrtených 50% buniek) \pm SD (smerodajná odchýlka), ktoré sú uvedené v Tab. 6 a 7. Zo získaných výsledkov môžeme vidieť, že bunková línia CHO-K1 vykazuje rôznu citlivosť k testovaným látkam. Taktiež boli zostrojené grafy závislosti koncentrácie testovaných takrínových derivátov na množstve usmrtených buniek, ktoré sú znázornené na Obr. 13 a 14.

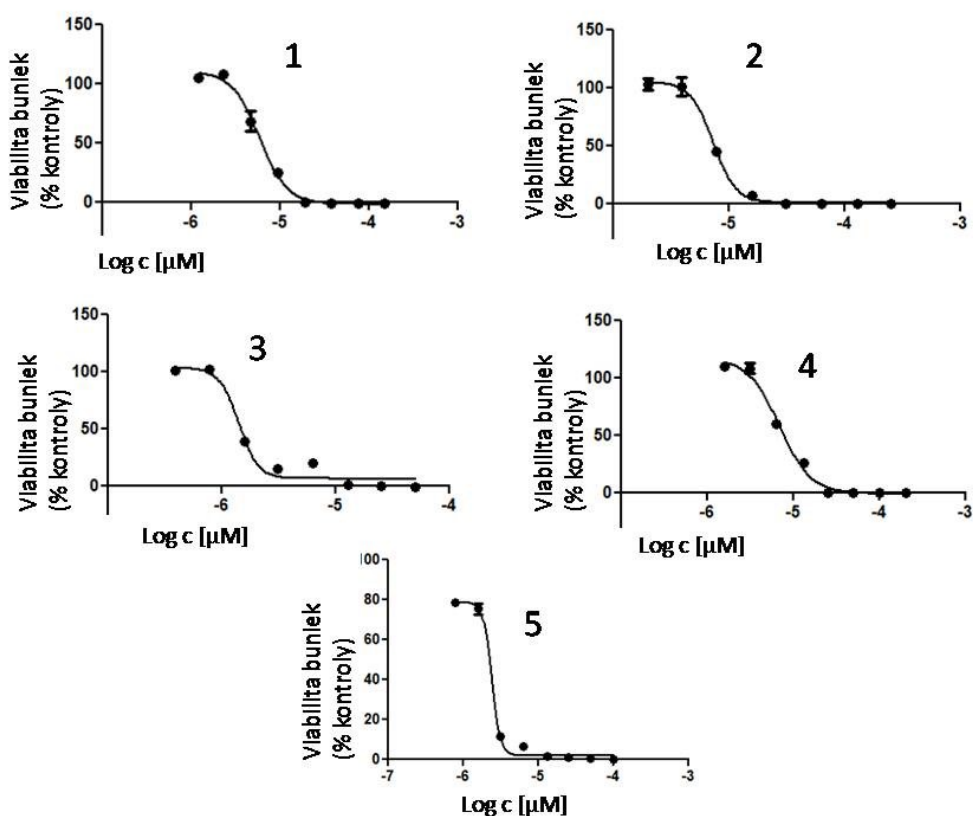
Tab. 6 *In vitro* cytotoxicita študovaných takrín – tiachinazolínových derivátov 1 – 5 v CHO-K1 bunkách.

Látka	$IC_{50} \pm SD$
	[μM]
1	4,91 \pm 2,02
2	5,83 \pm 2,14
3	2,89 \pm 1,62

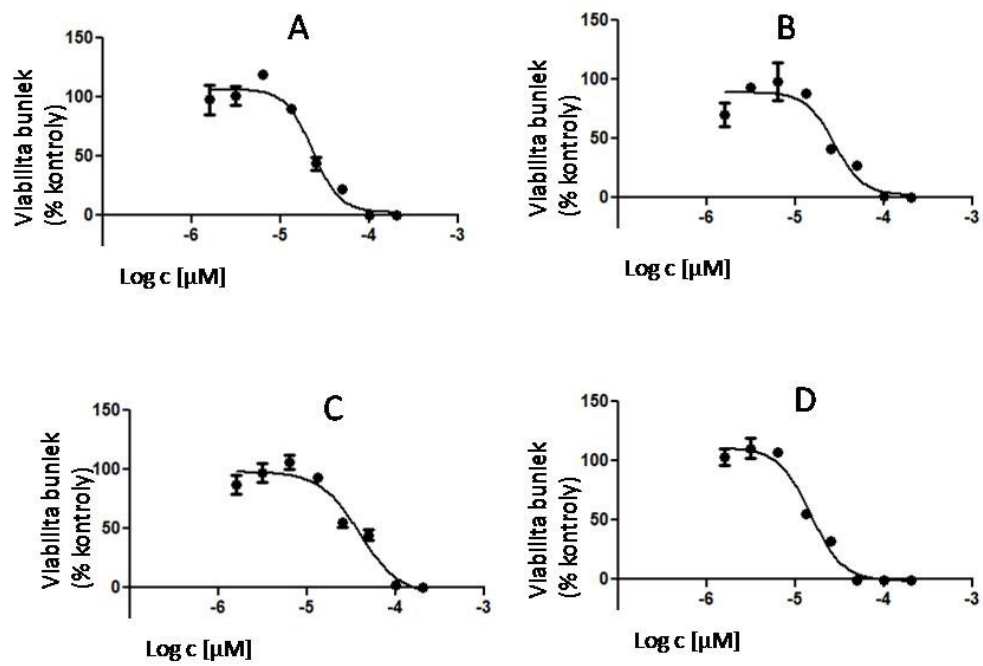
4	6,00 ± 2,44
5	2,31 ± 0,19

Tab. 7 *In vitro* cytotoxicita študovaných takrín – benzotiazolových derivátov A – D a benzotiazolu v CHO-K1.

Látka	IC ₅₀ ± SD [μM]
A	21,4 ± 2,11
B	25,4 ± 8,20
C	38,5 ± 2,42
D	15,3 ± 3,39
Benzotiazol	> 1000



Obr. 13 Účinok takrín-tiachinazolinových derivátov 1-5 na viabilitu CHO-K1 buniek.



Obr. 14 Účinnok takrín-benzotiazolových derivátov A-D na viabilitu CHO-K1 buniek.

7 Diskusia

Takrín patrí medzi prvé liečivá schválené Správou potravín a liečiv (FDA= Food and Drug Administration) na liečbu Alzheimerovej choroby, avšak vykazuje hepatotoxicitu a anticholinergné účinky (Crismon, 1994), preto sa navrhujú a syntetizujú jeho nové deriváty, ktoré by disponovali výhodnejšími vlastnosťami a menšími vedľajšími účinkami pri liečbe. Z tohto dôvodu boli v rámci tejto diplomovej práce skúmané novosyntetizované benzotiazolové **A-D** a tiachinazolínové **1-5** deriváty takrínu.

Jednou zo základných podmienok využívania liečiv pri ochoreniach CNS je ich prechodnosť cez HEB. Predikcia schopnosti testovaných látok prestupovať cez umelo vytvorenú membránu napodobňujúcu HEB bola v tejto diplomovej práci meraná metódou PAMPA v *in vitro* podmienkach pri pH= 7.4.

Pri prechode látok membránami pasívnou difúziou, ktorá je napodobňovaná pri metóde PAMPA, je dôležité, aby prechádzajúce látky mali určitú vyváženosť medzi lipofilitou a hydrofilitou. Keďže HEB má hydrofóbny charakter, ľahšie ňou prechádzajú lipofilné liečivá. Prílišná lipofilita však môže znamenať, že látky sa v membráne budú kumulovať a nedostanú sa na druhú stranu membrány (Trejtnar, 2016). Keďže hodnoty Log P (rozdeľovací koeficient oktanol/voda) testovaných látok znázornené v Tab. 3 majú hodnotu vyššiu ako 1, sú viac rozpustné v lipofilnom prostredí ako v hydrofilnom, čo je jeden z predpokladov pre prechod HEB pasívnou difúziou. Testované látky boli rozpustené v PBS. Ich absorbancia je dostatočne vysoká, aby boli koncentrácie v donorovej a akceptorovej časti stanovené UV/VIS spektrofotometriou. Dôkazom vhodnej rozpustnosti a dostatočne vysokej hodnoty absorbancie sú lineárne kalibračné krivky s vysokou hodnotou spoľahlivosti R^2 (viď Obr. 8 a 9).

Okrem prechodnosti testovaných látok bol taktiež uskutočnený experiment so štandardnými látkami, u ktorých je z literatúry známy ich prechod cez HEB. Boli použité donepezil a rivastigmín (inhibitory AChE), ktoré sú indikované na symptomatickú liečbu Alzheimerovej choroby (Chen et al., 2016). Ďalej bol testovaný ibuprofen (nesteroidné antiflogistikum), ktorý sa používa na tlmenie miernych alebo stredne silných bolestí a k symptomatickému mierneniu bolesti hlavy, vrátane migrény (Moore, Derry, 2013). Donepezil, rivastigmín a ibuprofen boli stanovené naším meraním ako pravdepodobne prechodné, čo potvrdili aj *in vivo* hodnoty logBB zistené v literatúre (Carpenter et al., 2014; Wang 2014). Sulfasalazín (črevné protizápalové liečivo) je indikovaný na terapiu

ulceróznej kolitídy, pri liečbe Crohnovy choroby a pri liečbe reumatoidnej artritídy (Gaubitz, 2017). Ranitidín (antagonista histamínových H_2 receptorov) je používaný na liečbu duodenálneho vredu, na terapiu stavov patologickej hypersekrécie a refluxnej gastroezofagitídy (Zacny et al., 2005). Furosemid (sulfónamidové diuretikum, odvodňovacie liečivo) sa používa pri liečbe opuchov (Gradalski, 2018). U ranitidínu, sulfasalazínu a furosemidu bola podľa nami určenej hodnoty Pe predpokladaná nízka permeabilita a taktiež z *in vivo* stanovených hodnôt $\log BB$ zistených v literatúre vyplýva neprechodnosť HEB (Bicker et al., 2016; Ooms et al., 2002). U týchto liečivých látok je ich prípadná prechodnosť cez HEB nežiadúca. Výsledné hodnoty Pe štandardných a testovaných látok sú uvedené v Tab. 5. Hodnoty Pe pre takrín-benzotiazolové deriváty **A-D** ($8,31-16,9 \times 10^{-6}$ cm/s) a takrín-tiachinazolínové deriváty **1, 3, 4** ($8,59-14,9 \times 10^{-6}$ cm/s) sú v korelácii so získanými hodnotami Pe pre CNS prechodné štandardné látky (pr. Pe pre rivastigmín $18,69 \times 10^{-6}$ cm/s). U týchto látok teda predpokladáme pravdepodobnosť prechodu cez HEB. Naopak, u takrín-tiachinazolínového derivátu **5** sa neprejavila schopnosť prechodu cez HEB. Jeho hodnota $Pe = 2,0 \times 10^{-6}$ cm/sa je porovnateľná s hodnotou Pe pre furosemid ($0,13 \times 10^{-6}$ cm/s), ktorý do CNS neprechádza (Di et al., 2003). Na základe vykonaného PAMPA experimentu sme u takrín-tiachinazolínového derivátu **2** určili obmedzenú prechodnosť, pretože získaná hodnota $Pe = 3,79 \times 10^{-6}$ cm/s spadá podľa L. Di a kol. do kategórie CNS +/- (Di et al., 2003). Najvyššiu hodnotu Pe dosiahol takrín-benzotiazolový derivát **C**, teda uňho je predpokladaná najvyššia schopnosť prechádzať cez HEB.

Počas experimentu sme sledovali aj zmenu koncentrácie látok v donorovej a akceptorovej časti použitej PAMPA aparatúry v závislosti na čase. Ako vidno na Obr. 11 (ako konkrétny príklad je uvedený takrín-benzotiazolový derivát C) pri študovaných takrín-benzotiazolových derivátoch **A-D** a takrín-tiachinazolínových derivátoch **1, 3 a 4** s rastúcim časom koncentrácia látok v akceptorovej časti rástla, zatiaľ čo koncentrácia v donorovej časti mala klesajúcu tendenciu, čo poukazuje na ich prechodnosť cez HEB. U takrín-tiachinazolínových derivátov **2 a 5** (konkrétnym príkladom na Obr. 11 je takrín-tiachinazolínový derivát **5**) síce koncentrácia v donorovej časti v závislosti na čase klesala, ale koncentrácia v akceptorovej časti nerástla, čo môže byť spôsobené tým, že látka sa zachytáva na membráne.

Keďže študované látky boli navrhnuté ako potenciálne liečivá na liečbu Alzheimerovej choroby a predpokladá sa aj ďalšie testovanie *in vivo*, je nutné poznať ich bezpečnostný profil. Preto sme testovali ich cytotoxicitu metódou MTT. K živým CHO-

K1 bunkám boli pridávané jednotlivé roztoky látok a bolo zisťované, nakoľko sú tieto bunky schopné v prostredí látok prežiť. MTT test je založený na schopnosti živých buniek redukovať žltú MTT na nerozpustný modrý formazán. Táto schopnosť sa monitoruje spektrofotometricky a hodnota absorbancie poukazuje na množstvo živých buniek. Reakcia je aj farebne viditeľná. Čím je farba tmavšia (vyššia hodnota meranej absorbancie), tým je v jamke viac živých buniek, teda tým má sledovaná látka v danej koncentrácii nižšiu toxicitu. V rámci MTT testu sa stanovuje hodnota IC_{50} , podľa ktorej je porovnaná cytotoxicita jednotlivých takrín-tiachinazolínových, takrín-benzotiazolových derivátov a štandardných látok. Platí, že čím je IC_{50} vyššia, tým je potrebná vyššia koncentrácia stanovovanej látky na usmrtenie buniek, teda tým má látka nižšiu toxicitu (Florento et al., 2012). U samotného benzotiazolu bola zistená nízka cytotoxicita, zatiaľ čo u takrín-benzotiazolových derivátov **A-D** bola toxicita oproti benzotiazolu niekoľkokrát vyššia. Z výsledkov uvedených v Tab. 7 a 8 vyplýva, že takrín-benzotiazolové deriváty **A-D**, u ktorých sa IC_{50} pohybuje v rozmedzí 15,3 - 38,5 μM , sú menej toxické ako takrín-tiachinazolínové deriváty **1-5**, ktorých hodnota IC_{50} dosahuje hodnoty 2,31 - 6,0 μM . Z takrín-benzotiazolových derivátov bol najmenej toxický derivát **C** a z takrín-tiachinazolínových derivátov **4**. V porovnaní s takrínom, ktorého hodnota IC_{50} je 116 μM (Soukup et al., 2013), vykazujú všetky testované látky vyššiu cytotoxicitu. Taktiež sme IC_{50} testovaných takrín-tiachinazolínových a takrín-benzotiazolových derivátov porovnávali s inými študovanými derivátmi takrínu, napríklad so 7-MEOTA, ktorého IC_{50} má hodnotu 39 μM (Soukup et al., 2013), teda je z hľadiska cytotoxicity porovnateľný s takrín-benzotiazolovým derivátom **C**. Vyššia hodnota IC_{50} derivátov takrínu ako u samotného takrínu však ešte nemusí znamenať, že sú menej vhodné na klinické používanie. Dôležité je stanovenie cytotoxicity pri koncentrácii, pri ktorej dochádza k účinku týchto látok, teda koncentrácie, ktorá je nutná na inhibíciu AChE. Ak pri tejto koncentrácii nedochádza k smrti buniek, liečivo nie je pri tejto koncentrácii cytotoxické. Príkladom je experiment, ktorý prevádzali Chufarova N. a kol. s takrín-akridínovými hybridnými molekulami, kde merali koncentráciu potrebnú na inhibíciu AChE a taktiež merali ich cytotoxicitu a porovnávali tieto hodnoty s takrínom. Pri najúčinnjšom deriváte zistili, že pri koncentrácii nutnej na účinok (derivát vykazoval vyššiu aktivitu na inhibíciu AChE ako takrín), táto látka nevykazovala významnú cytotoxicitu (Chufarova et al., 2018).

8 Záver

Vypracovaním tejto diplomovej práce sme dospeli k záveru, že nami testované takrín-benzotiazolové deriváty **A-D** a takrín-tiachinazolínové **1, 3** a **4** sú pravdepodobne prechodné cez HEB. Vypočítaná hodnota *Pe* týchto prechodných derivátov, získaná z hodnôt meraných metódou PAMPA bola v rozmedzí $8,31-16,9 \times 10^{-6}$ cm/s. Ako neprechodný sme určili takrín-tiachinazolínový derivát **5** a obmedzenú prestupnosť dosiahol derivát **2**. Avšak, touto metódou sme určili len predikciu prechodnosti a taktiež nebol zohľadnený možný aktívny transport testovaných látok, takže na získanie komplexnejších výsledkov je nutné použiť presnejšie metódy, ako napríklad kombináciu metódy PAMPA s testovaním transportu na bunkových líniách alebo *in vivo* metódy.

Z hľadiska cytotoxicity sme zistili, že nami testované takrín-tiachinazolínové a takrín-benzotiazolové deriváty sú toxickejšie ako samotný benzotiazol a takrín, z ktorých vychádzala ich syntéza. Dôležité je však stanoviť aj koncentráciu, pri ktorej dochádza k aktivite týchto látok, teda koncentráciu, pri ktorej inhibujú AChE a pri tejto koncentrácii určiť, nakoľko pôsobia tieto deriváty cytotoxicky.

V konečnom dôsledku, táto práca poukazuje na nové takrínové deriváty ako na potencionálne liečivá na Alzheimerovu chorobu, avšak na zistenie ich skutočného potenciálu je nutné ďalšie *in vitro* a *in vivo* testovanie.

9 Použitá literatura

Aller S. G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell P. M., Trinh Y. T., Zhang Q., Urbatsch I. L., Chang G. Structure of P-glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* 2009; 323(5922): 1718–1722.

Bickel U., How to Measure Drug Transport across the Blood-Brain Barrier. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics* 2005; 2: 15–26.

Bicker J., Alves G., Fortuna A., Soares-da-Silva P., Falcão A. A new PAMPA model using an in-house brain lipid extract for screening the blood–brain barrier permeability of drug candidates. *International Journal of Pharmaceutics* 2016; 501: 102–111.

Burns A., Iliffe S. Alzheimer's disease. *British Medical Journal* 2009; 338: b158.

Carpenter T. S., Kirshner D. A., Lau E. Y., Wong S. E., Nilmeier J. P., Lighstone F. C. A Method to Predict Blood-Brain Barrier Permeability of Drug-Like Compounds Using Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal* 2014; 107: 630-641.

Chen Y. D., Zhang J., Wang Y., Yuan J. L., Hu W. L. Efficacy of Cholinesterase Inhibitors in Vascular Dementia: An Updated Meta-Analysis. *European Neurology* 2016; 75: 132-141.

Chufarova N., Czarnecka K., Skibiński R., Cuchra M., Majsterek I., Szymański P. New tacrine-acridine hybrids as promising multifunctional drugs for potential treatment of Alzheimer's disease. *Archiv der Pharmazie* 2018; 351 (7): e1800050.

Crismon L. M. Tacrine: First Drug Approved for Alzheimer's Disease. *Anal. of Pharmacotherapy* 1994; 28: 744-751.

Degushi Y. Application of In Vivo Brain Microdialysis to the Study of Blood-Brain Barrier Transport of Drugs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2002; 17(5): 395-407.

Di L., Kerns E. H., Fan K., McConnell O. J., Carter G. T. High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2003; 38: 223-232.

Faller B. Artificial Membrane Assays to Assess Permeability. *Current Drug Metabolism* 2008; 9: 886-892.

Flynn D., Mash D. C. Multiple in vitro interactions with and differential in vivo regulation of muscarinic receptor subtypes by tetrahydroaminoacridine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1989; 250 (2): 573-581.

Florento L., Matias R., Tuaño E., Santiago K., dela Cruz F., Tuazon A. Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using In Vitro Cell-Based Approach. *International journal of Biomedical Science* 2012; 8: 76-80.

Gatz M., Reynolds C.A., Fratiglioni L., Johansson B., Mortimer J. A., Berg S., Fiske A., Pedersen N. L. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry* 2006; 63 (2): 168-174.

Gaubitz M. Rheumatic Manifestations in Chronic Inflammatory Bowel Disease: Clinical Features, Diagnosis and Treatment. *Aktuelle Rheumatologie* 2017; 42: 505-511.

Gross P. M. Circumventricular organ capillaries. *Progress in brain research* 1992; 91: 219-233.

Gradalski T. Diuretics Combined With Compression in Resistant Limb Edema of Advanced Disease - A Case Series Report. *Journal Of Pain And Symptom Management* 2018; 55 (4): 1179-1183.

Hall K., Murrell J., Ogunniyi A., Deeg M., Baiyewu O., Gao S., Gureje O., Dickens J., Evans R., Smith-Gamble V., Unverzagt F. W. J., Shen J., Hendrie H. Cholesterol, APOE genotyp and Alzheimer disease: An epidemiologic study of Nigerian Yoruba. *Neurology* 2006; 66: 223-227.

Hammarlund-Udenaes M., Fridén M., Syvänen S., Gupta A. On The Rate and Extent of Drug Delivery to the Brain. *Pharmaceutical Research* 2008; 28: 1737-1750.

Hardy J., Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences* 1991; 12 (10): 383-388.

Iqbal K., Alonso A. del C., Chen S., Chohan M. O., El-Akkad E., Gong C. X., Khatoon S., Li B., Liu F., Rahman A., Tanimukai H., Grundke-Iqbal I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1739 (2-3): 198-210.

Jiráková R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* 2009; 19: 342–345.

Kerns E. H., Di L., Petusky S., Farris M., Ley R., Jupp P. J. Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; 93(6):1440-1453.

Korabecny J., Dolezal R., Cabelova P., Horova A., Hrubá E., Ricny J., Sedlacek L., Nepovimova E., Spilovska K., Andrs M., Musilek K., Opletalova V., Sepsova V., Ripova D., Kuca K. 7-MEOTA-donepezil like compounds as cholinesterase inhibitors: Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modeling and QSAR studies. *European journal of medicinal chemistry* 2014; 82: 426-38.

Kozurkova M., Hamulakova S., Gazova Z., Paulikova H., Kristian P. Neuroactive Multifunctional Tacrine Congeners with Cholinesterase, Anti-Amyloid Aggregation and Neuroprotective Properties. *Pharmaceuticals* 2011; 4: 382-418.

Kuhnline Sloan C. D., Nandi P., Linz T. H., Aldrich J. V., Audus K. L., Lunte S. M. Analytical and Biological Methods for Probing the Blood-Brain Barrier. *Annual Review of Analytical Chemistry* 2012; 5: 505–531.

Liu W., Okochi H., Benet L. Z., Zhai S. D. Sotalol permeability in cultured-cell, rat intestine, and PAMPA system. *Pharmaceutical research* 2012; 29 (7): 1768-74.

Loryan I., Fridén M., Hammarlund-Udenaes M. The brain slice method for studying drug distribution in the CNS. *Fluids and Barriers of the CNS* 2013; 10:6.

Masungi C., Mensch J., Van Dijck A., Borremans C., Willems B., Mackie C., Noppe M., Brewster M. E. Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) combined with a 10-day multiscreen Caco-2 cell culture as a tool for assessing new drug candidates. *Pharmazie* 2008; 63: 194–199.

Mensch J., Jaroskova L., Sandersonb W., Melisc A., Mackiec C., Verrecka G., Brewstera M. E., Augustijnsd P. Application of PAMPA-models to predict BBB permeability including efflux ratio, plasma protein binding and physicochemical parameters. *International Journal of Pharmaceutics* 2010; 395: 182–197.

Moore R. A., Derry C. Efficacy of OTC analgesics. *Journal of Clinical Practise* 2013; 67: 21–25.

Müller J., Essó K., Dargó G., Könczöl Á., Balogh G.T. Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015; 79: 53–60.

Oldendorf W. H. Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. *Brain Research* 1970; 24: 372-376.

Omidi Y., Barar J. Impacts of Blood-Brain Barrier in Drug Delivery and Targeting of Brain Tumors. *BioImpacts* 2012; 2 (1): 5-22.

Ooms F., Weber P., Carrupt P. A., Testa B. A simple model to predict blood–brain barrier permeation from 3D molecular fields. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1587: 118–125.

Ottaviani G., Martel S., Carrupt P. A. Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *Journal of medicinal chemistry* 2006; 49 (13): 3948-3954.

Shityakov S., Salvador E., Förster C. In silico, in vitro, and in vivo methods to analyse drug permeation across the blood-brain barrier: A critical review. *OA Anaesthetics* 2013; 1 (2): 13.

Soukup O., Jun D., Zdarova-Karasova J., Patocka J., Musilek K., Korabecny J., Krusek J., Kaniakova M., Sepsova V., Mandikova J., Trejtnar F., Pohanka M., Drtinova L., Pavlik M., Tobin G., Kuca K. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Current Alzheimer research* 2013; 10 (8): 893-906.

Stamatovic S. M., Keep R. F., Andjelkovic A. V. Brain Endothelial Cell-Cell Junctions: How to “Open” the Blood Brain Barrier. *Current Neuropharmacology* 2008; 6: 179-192.

Stockert J. C., Horobin R. W., Colombo L.L., Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica* 2018; 120:159-167.

Szymański P., Skibiński R., Inglot T., Bajda M., Jończyk J., Malawska B., Mikiciuk-Olasik A. New Tacrine Analogs as Acetylcholinesterase Inhibitors - Theoretical Study with Chemometric Analysis. *Molecules* 2013; 18: 2878-2894.

Takasato Y., Rapoport S. I., Smith Q. R. An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *American Journal of Physiology* 1984; 247: 484-493.

Trejtnar F. Základní mechanismy transportu léčiv v organismu. *Remedia* 2016; 46 (5): 460-463.

Verbeeck K. V. Blood microdialysis in pharmacokinetic and drug metabolism studies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 45: 217-228.

Wagstaff A. J., McTavish D. Tacrine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease. *Drugs Aging* 1994; 4 (6): 510-540.

Wang L., Esteban G., Ojima M., Bautista-Aguilera O. M., Inokuchi T., Moraleda I., Iriepa I., Samadi A., Youdim M. B. H., Romero A., Soriano E., Herrero R., Fernández Fernández A. P., Martínez-Murillo R., Marco-Contelles J., Unzeta M. Donepezil + propargylamine + 8-hydroxyquinoline hybrids as new multifunctional metal-chelators, ChE and MAO inhibitors for the potential treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 80: 543-561.

Winkler E. A., Bell R. D., Zlokovic B. V. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature Neuroscience* 2011; 14: 1398–1405.

Zacny J., Zamakhshary M., Sketris I., Van Zanten S. V. Systematic review: the efficacy of intermittent and on-demand therapy with histamine H₂-receptor antagonists or proton pump inhibitors for gastro-oesophageal reflux disease patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2005; 21: 1299-1312.

Internetové zdroje:

Schmidt D., Lynch J. Evaluation of the reproducibility of Parallel Artificial Membrane Permeation Assays (PAMPA), Application notes, 2003. Dostupné na URL: [https://www.merckmillipore.com/SK/sk/search/MultiScreen%20Filter%20Plates%20for%20PAMPA%3A%20Evaluation%20of%20the%20reproducibility%20of%20Parallel%20Artificial%20Membrane%20Permeation%20Assays%20\(PAMPA\)?search=&TrackingSearchType=SB+-+Search+Result+Search+Box&SearchContextPageletUUID=&SearchTerm=MultiScreen+Filter+Plates+for+PAMPA%3A+Evaluation+of+the+reproducibility+of+Parallel+Artificial+Membrane+Permeation+Assays+%28PAMPA%29](https://www.merckmillipore.com/SK/sk/search/MultiScreen%20Filter%20Plates%20for%20PAMPA%3A%20Evaluation%20of%20the%20reproducibility%20of%20Parallel%20Artificial%20Membrane%20Permeation%20Assays%20(PAMPA)?search=&TrackingSearchType=SB+-+Search+Result+Search+Box&SearchContextPageletUUID=&SearchTerm=MultiScreen+Filter+Plates+for+PAMPA%3A+Evaluation+of+the+reproducibility+of+Parallel+Artificial+Membrane+Permeation+Assays+%28PAMPA%29)

Přístup: 9.4.2017.