

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**LC-MS ANALÝZA I. FÁZE BIOTRANSFORMACE K1277,
POTENCIÁLNÍHO LÉČIVA ALZHEIMEROVY NEMOCI**

Diplomová práce

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

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

Hradec Králové 2018

Lucie Krchová

„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 řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

V Hradci Králové dne 29. 8. 2018

.....
Lucie Krchová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce **Prof. PharmDr. Františku Štaudovi, Ph.D.** a konzultantovi specialistovi **Mgr. et Mgr. Rafaelu Doležalovi, Ph.D.** za jejich odborné vedení a cenné rady během vypracování diplomové práce, za ochotu, čas a vstřícnost věnované konzultacím práce a v neposlední řadě za jejich podporu a pozitivní přístup. Dále bych chtěla poděkovat **Doc. Ing. Milošovi Hrochovi, Ph.D.** z Lékařské fakulty UK za poskytnutí návrhu metabolického experimentu. Také bych ráda poděkovala Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice v Hradci Králové a všem jeho zaměstnancům za poskytnutí laboratoří a veškerého vybavení a pomoci při měření experimentálních dat a Katedře vojenské farmacie a toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany za syntézu a dodání zkoumané látky a poskytnutí informací k ní. Na závěr bych také ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu a toleranci nejen v době vypracovávání této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Lucie Krchová

Školitel: Prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

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

Název diplomové práce: **LC-MS analýza 1. fáze biotransformace K1277, potenciálního léčiva Alzheimerovy nemoci.**

Alzheimerova choroba patří mezi nejčastější neurodegenerativní onemocnění, kterým trpí desítky miliónů lidí na celém světě. V současné terapii se vyskytuje několik symptomatických léčiv, která dokáží zmírnit příznaky tohoto typu demence, nicméně žádné z nich není schopno progresi nemoci úplně zastavit.

Diplomová práce se věnuje metabolické studii dosud nepublikované látky K1277, vzniklé kombinací 6-chlortakrinu a aminokyseliny tryptofanu, která se řadí díky svým vlastnostem k slibným potenciálním léčivům Alzheimerovy nemoci. Cílem práce bylo provést *in vitro* metabolický screening látky K1277 na modelu využívající lidské jaterní mikrosomy se zaměřením na kvantitativní i kvalitativní analýzu. Dílčími cíli bylo zjistit, za jakých podmínek poskytuje látka K1277 metabolity první fáze biotransformace, kvantifikovat množství metabolisované látky, identifikovat jednotlivé metabolity a navrhnout jejich chemické struktury.

Diplomová práce popisuje analýzu metabolitů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Pro analýzu metabolitů byla využita univerzální 15minutová metoda s gradientovou elucí (kolona Kinetex C18, 150 x 3 mm, 2,6 um, 100 Å) v pozitivním módu za využití hmotnostních záznamů Full MS/AIF a Full MS/dd-MS².

V rámci této diplomové práce bylo zjištěno, že látka K1277 poskytuje metabolity při všech studovaných dobách inkubací látky K1277 s lidskými jaterními mikrosomy, a to s rozdílnou intenzitou jednotlivých metabolitů. U experimentů s jednogodinovou a šestihodinovou inkubací látky K1277 s HLM byla zaznamenána pouze stopová množství metabolitů. Značně intenzivnější metabolity látky K1277 byly zaznamenány

po dvaceti čtyřhodinové inkubaci látky K1277 s HLM, u které byla dále provedena kvantitativní a kvalitativní analýza biotransformace látky K1277. Výsledky práce uvádí přehled pěti hlavních metabolitů látky K1277 a jejich navržené hypotetické chemické struktury. Současně byl stanoven procentuální úbytek biotransformované látky u jednotlivých koncentrací, ve kterých byla látka K1277 testována.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Lucie Krchová

Supervisor: Prof. PharmDr. František Štaud, Ph.D.

Supervisor - Consultant: Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Title of diploma thesis: **LC-MS analysis of phase one biotransformation of K1277, a potential drug against Alzheimer's disease.**

Alzheimer's disease belongs to the most common neurodegenerative diseases that several millions of people all around the world suffer from. There are few symptomatic drugs, which are able to reduce signs and symptoms of this type of dementia, however none of them is able to completely stop it.

The diploma thesis is focused on a metabolomic study of compound K1277, synthesized as a combination of 6-chlortacrine and aminoacid tryptophan, which thanks to its properties belongs to promising potential drugs against Alzheimer's disease and which has not been published yet.

The aim of this diploma thesis was to perform *in vitro* metabolomic screening of the compound K1277 using human liver microsomes focusing on qualitative and quantitative analysis. As intermediate aims of the thesis, necessary conditions for sufficient biotransformation of compound K1277 were investigated, quantity of metabolised compound K1277, identifications of particular metabolites and proposition of their chemical structures were provided.

The studied compound and its metabolites were analysed by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (LC-MS/MS). An universal gradient elution method of fifteen minutes (using column Kinetex C18, 150 x 3 mm, 2,6 μm , 100 \AA) in a positive mode together with mass scans Full MS/AIF and Full MS/dd-MS² were used for analysis of the metabolites.

Within the diploma thesis was found that chemical compound K1277 provides metabolites during all studied incubation periods with human liver microsomes in different intensity. Experiments with one and six hour period of incubation revealed

only trace amount of the metabolites. Therefore, we focused on an experiment with incubation of twenty four hours and performed qualitative and quantitative analysis. The results of the diploma thesis present a summary of five metabolites of the compound K1277 and their suggested hypothetical chemical structures. In the quantitative part of the results, proportional decrease of compound K1277 metabolised after every incubation period with HLM was determined on each of the tested concentration level.

OBSAH

1.	SEZNAM ZKRATEK	10
2.	ÚVOD.....	13
3.	TEORETICKÁ ČÁST	15
3.1	METABOLISMUS LÉČIV	15
3.1.1	I. FÁZE BIOTRANSFORMACE LÉČIV	15
3.1.2	II. FÁZE BIOTRANSFORMACE LÉČIV.....	19
3.1.3	<i>IN VITRO</i> METODY METABOLISMU.....	20
3.2	ALZHEIMEROVA CHOROBA	24
3.2.1	TYPY ALZHEIMEROVY CHOROBY.....	24
3.2.2	PATOFYZIOLOGIE ALZHEIMEROVY CHOROBY	25
3.2.3	KLINICKÝ OBRAZ.....	27
3.2.4	DIAGNÓZA	28
3.2.5	LÉČBA.....	28
3.2.6	METABOLISMUS TAKRINU A ODVOZENÝCH STRUKTUR	32
3.2.7	METABOLISMUS TRYPTOFANU.....	34
3.3	SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ	37
3.3.1	VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	37
3.3.2	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	40
4.	CÍL PRÁCE.....	45
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46

5.1	POUŽITÝ MATERIÁL	46
5.1.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	46
5.1.2	CHEMIKÁLIE	46
5.1.3	ZÁSOBNÍ ROZTOKY	47
5.2	TECHNICKÉ VYBAVENÍ	48
5.2.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	48
5.2.2	POMŮCKY	48
5.2.3	VÝPOČETNÍ PROGRAMY	48
5.3	ZKOUMANÁ LÁTKA K1277	49
5.4	MIKROSOMÁLNÍ METABOLICKÁ STUDIE LÁTKY K1277	50
5.4.1	METODICKÝ POSTUP EXPERIMENTŮ	50
5.4.2	MĚŘENÍ NA LC-MS	51
5.4.3	VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	53
6.	VÝSLEDKY	56
6.1	KVALITATIVNÍ ANALÝZA	56
6.1.1	PARENTNÍ LÁTKA K1277	56
6.1.2	METABOLITY LÁTKY K1277	60
6.2	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA	82
7.	DISKUSE	85
8.	ZÁVĚR	92
9.	LITERATURA	93

1. SEZNAM ZKRATEK

Zkratka	Význam zkratky	Český ekvivalent zkratky
ACN	Acetonitrile	Acetonitril
ADAS-cog	Alzheimer disease assessing scale - cognitive subscale	Kognitivní hodnotící škála Alzheimerovy nemoci
Ach	Acetylcholine	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase	Acetylcholinesteráza
AD	Alzheimer disease	Alzheimerova choroba
APCI	Atmospheric-pressure chemical ionization	Ionizace za atmosférického tlaku
APO-E	Apolipoprotein E	Apolipoprotein E
APP	Amyloid precursor protein	Amyloidový prekurzorový protein
APPI	Atmospheric-pressure photoionization	Fotoionizace za atmosférického tlaku
BChE	Butyrylcholinesterase	Butyrylcholinesteráza
CDK	Cyclin dependent kinase	Cyklindependentní kináza
CNS	Central nervous system	Centrální nervový systém
CYP	Cytochrome P450	Cytochrom P450
EH	Epoxide hydrolase	Epoxidová hydroláza
ESI	Electrospray ionization	Ionizace elektrosprejem
FA	Formic acid	Kyselina mravenčí
FMO	Flavin monooxygenase	Flavinmonooxidáza
GSK	Glycogen sythase kinase	Glykogen syntáza kináza
GST	Glutathione-S-transferase	Glutation-S-transferáza
6-CHTA	6-chlortacrine	6-chlortakrin
HEB	Hematoencephalic barrier	Hematoencefalická bariéra
HLM	Human liver microsomes	Lidské jaterní mikrosomy

IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase	Indolamin-2,3-dioxygenáza
LC-MS	Liquid chromatography coupled with mass spectrometry	Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	Mitogenem aktivovaná protein kináza
MAPs	Microtubules associated proteins	Mikrotubuly asociované proteiny
MCM	Multiple-compound medication	Terapie více léčivý inkorporovaných do jedné lékové formy
MF	Mobile phase	Mobilní fáze
MMSE	Mini mental state examination	Test kognitivních funkcí
MMT	Multiple-medication therapy	Terapie více léčivý najednou
MRI	Magnetic resonance imaging	Magnetická rezonance
MRM	Multiple reaction monitoring	Fragmentace více iontů
MTDL	Multi-target-directed ligand	Terapie více léčivý spojených do jedné chemické struktury
NADP	Nicotineamide adenine dinucleotide phosphate	Nikotin-amidadenin-dinukleotidfosfát
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinonimine	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
NAT	<i>N</i> -Acetyltransferase	<i>N</i> -Acetyltrasferáza
NCE	New chemical entity	Nová chemická entita
NFT	Neurofibrillary tangles	Neurofibrilární klubka
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartic acid	<i>N</i> -metyl- <i>D</i> -asparagová kyselina
NMR	Nuclear magnetic resonance	Nukleární magnetická rezonance

PAPS	3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PET	Positron emission tomography	Pozitronová emisní tomografie
PSEN 1, 2	Presenilin 1, 2	Presenilin 1, 2
SIM	Selected-ion-monitoring	Záznam jednoho iontu
SRM	Selected-reaction-monitoring	Fragmentace jednoho iontu
SULT	Sulfotransferase	Sulfotransferáza
TDO	Tryptophan-2,3-dioxygenase	Tryptofan-2,3-dioxygenáza
TIC	Total ion current	Chromatogram celkového iontového proudu
TRP	Tryptophane	Tryptofan
UGT	Uridindiphosphat - glucuronosyltransferase	Uridindifosfát - glukuronosyltransferáza
UV-VIS	Ultraviolet-visible spectroscopy	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
XIC	Extracted ion current	Extrahovaný chromatogram

2. ÚVOD

S neustále zvyšujícími se nároky na kvalitu a bezpečnost léčiv během celého jejich vývoje roste také význam preklinického hodnocení léčiv. Preklinický výzkum zajišťuje komplexní profilaci léčiva z hlediska farmakokinetiky, farmakodynamiky i toxicity, a naznačuje tak možnosti použití přípravku v klinické fázi výzkumu. Jednou z hlavních částí preklinického výzkumu je *in vitro* metabolická studie, která společně se studiem absorpce, distribuce a exkrece (tzv. ADME) poskytuje klíčové informace pro další výzkum potenciálního léčiva nebo naopak pro ukončení jeho výzkumu. Vzhledem k faktu, že metabolické přeměny léčiv probíhají nejvíce v játrech, měla by *in vitro* metabolická studie co nejvíce korelovat s *in vivo* jaterním metabolismem. Z tohoto důvodu se při *in vitro* metodách pracuje na modelech získávaných různými technologiemi z jater, jako jsou supersomy, cytosolové jaterní frakce, jaterní řezy a v současnosti stále nejvíce používané mikrosomy, které byly také použity v této práci (Brandon et al. 2003).

Vzhledem ke klíčové roli metabolismu v rámci preklinického výzkumu léčiv, je tato diplomová práce zaměřena právě na metabolickou studii potenciálního léčiva, a to konkrétně pro léčbu Alzheimerovy nemoci.

Alzheimerova choroba patří mezi neurodegenerativní onemocnění, které postihuje stále více pacientů. V roce 2014 čítal počet nemocných téměř 24 miliónů a odhaduje se, že do roku 2050 se jeho výskyt zvýší ještě čtyřikrát (Reitz a Mayeux, 2014). Vzhledem k absenci kauzálního léčiva v současné terapii AD, které by dokázalo toto onemocnění vyléčit, je kladen velký důraz na výzkum a vývoj léčiv potenciálních (Romero et al. 2013). V rámci této diplomové práce jsem se zaměřila na studium potenciálního léčiva AD s označením K1277 odvozeného od 6-chlortakrinu a aminokyseliny tryptofanu. Struktura 6-chlortakrinu je modifikovanou strukturou takrinu, který byl zaveden do praxe jako historicky první léčivo AD. Pro svou hepatotoxicitu a gastrointestinální nežádoucí účinky byl ale takrin stažen z trhu (Romero et al. 2013). Nadále však probíhají studie s léčivy odvozenými od struktury takrinu, které by vykazovaly nižší toxicitu pro pacienta a měly zachovaný účinek v inhibici acetylcholinesterázy (AChE) (Spilovska et al. 2017). Látka K1277 byla navržena, syntetizována a biologicky testována v rámci vývoje a výzkumu nových léčiv neurodegenerativních onemocnění v Centru biomedicínského výzkumu fakultní nemocnice Hradec Králové a Katedry toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany.

Tato sloučenina představuje novou chemickou entitu (NCE) a dle dostupné odborné literatury nejsou prozatím známy její metabolické vlastnosti.

Provedení metabolické studie nové látky a charakterizace jejích metabolitů představuje velmi náročnou úlohu, vyžadující náležitou analytickou instrumentaci a pokročilé znalosti zejména z oblasti hmotnostní spektrometrie (Ahuja a Rasmussen, 2007). Nicméně pro látku, která má podobnou strukturu jako K1277 byla již metabolická studie publikována a metodika této diplomové práce je založena právě na ní (Nepovimová et al. 2015). Pro analýzu metabolitů látky K1277 byl využit analytický systém spojující vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometrem. Klíčový pro návrh struktury metabolitů se stal zejména tento hmotnostní spektrometr díky své přesnosti a správnosti poskytovaných výsledků. Tato metoda je hojně využívána nejen při vývoji nového léčiva, ale také během klinických studií léčiv a i po zavedení léčiva na trh. Řadí se tak mezi vůbec nejpoužívanější metody v bioanalýze léčiv (Ahuja a Rasmussen, 2007).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 METABOLISMUS LÉČIV

Každý organismus je vystaven vlivu xenobiotik z okolí, ať už se jedná o zplodiny znečišťující ovzduší, o chemické látky s využitím v zemědělství, o kosmetiku nebo léčiva. Metabolismus neboli biotransformace je označení jedné z fází farmakokinetiky, při které dochází k přeměně struktury xenobiotika většinou ve více polární a ve vodě rozpustnou látku. Tato přeměna má za následek usnadnění exkrece xenobiotika z organismu. Metabolismus léčiv vede zpravidla k tvorbě metabolitů se sníženou účinností oproti parentní látce. U některých léčiv vznikají metabolity se stejnou nebo intenzivnější biologickou aktivitou. Vysvětluje se tak například dlouhý biologický poločas diazepamu, který se biotransformuje na několik farmakologicky aktivních metabolitů (Yang et al. 1998). Některé látky naopak vyžadují biotransformaci pro zajištění jejich účinku. Tyto látky se označují jako proléčiva a řadíme mezi ně například imipramin, inhibitory angiotenzinkonvertujícího enzymu nebo azathioprin (Eklund et al. 2007, Clementi a Fumagali, 2012). V neposlední řadě může docházet také ke vzniku toxických metabolitů jako je *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) uvolňující se při biotransformaci paracetamolu (Ramachandran a Jaeschke, 2017). Z tohoto i dalších důvodů je studium metabolismu nedílnou součástí preklinických i klinických studií léčiv.

Metabolismus léčiv je děj probíhající vlivem nejrůznějších enzymů a právě na základě typu enzymatických reakcí a typu přeměny struktury xenobiotika ho lze klasifikovat na metabolismus první a druhé fáze.

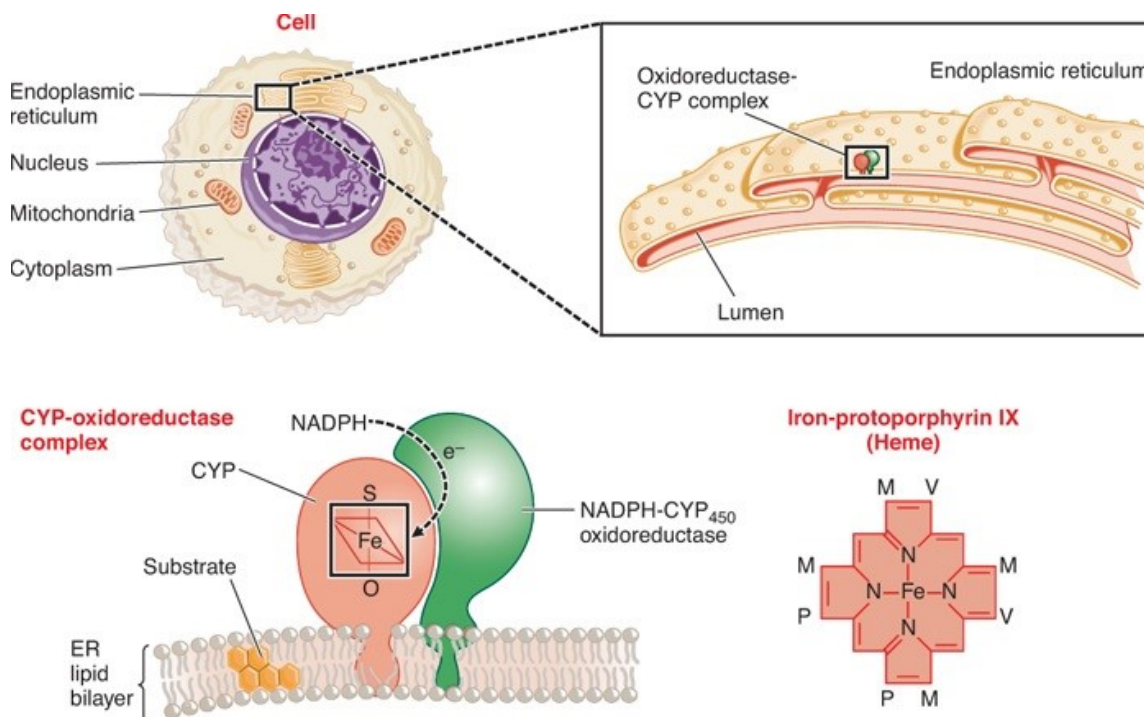
3.1.1 I. FÁZE BIOTRANSFORMACE LÉČIV

Během první fáze metabolismu dochází k zavedení polárních skupin nebo k jejich odkrytí v molekule léčiva za účelem usnadněného navázání endogenní molekuly v druhé fázi metabolismu. Metabolity první fáze vznikají oxidací, redukcí nebo hydrolýzou, méně často kombinací těchto reakcí (Clementi a Fumagali, 2012).

Oxidace

Nejdůležitější a nejvíce zastoupenou reakcí během první fáze metabolismu je oxidace (Clementi a Fumagali, 2012). Systém oxidačních enzymů je převážně lokalizován na hladkém endoplazmatickém retikulu hepatocytů v játrech, setkat se s ním ale můžeme i v jiných tkání, jako je gastrointestinální mukóza, plíce, ledviny, kůže nebo mozek (Krishna et al, 1994). Z nejvíce zastoupených enzymů oxidačního systému lze jmenovat cytochrom P450 (CYP), flavinové monooxygenázy (FMO), a epoxidové hydrolázy (EH). Další oxidázy, převážně substrát-selektivní, lze také najít v mitochondriích.

Cytochrom P450 je membránově vázaný protein v endoplazmatickém retikulu, obsahující strukturu hemu (Obr. 1). Katalyzuje několik typů reakcí, které jsou založené na principu zavedení atomu kyslíku do molekuly léčiva (Clementi a Fumagali, 2012).

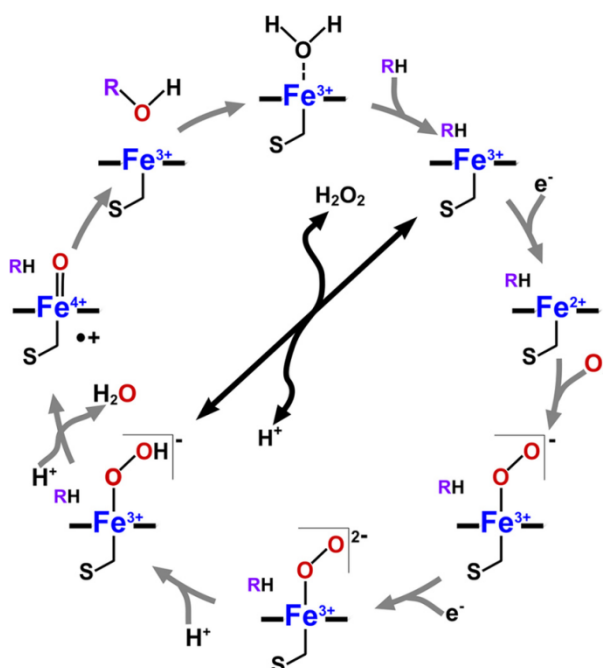


Obr. 1: Umístění cytochromů v membráně endoplazmatického retikula a struktura hemu.

Převzato z: Brunton et al. 2005

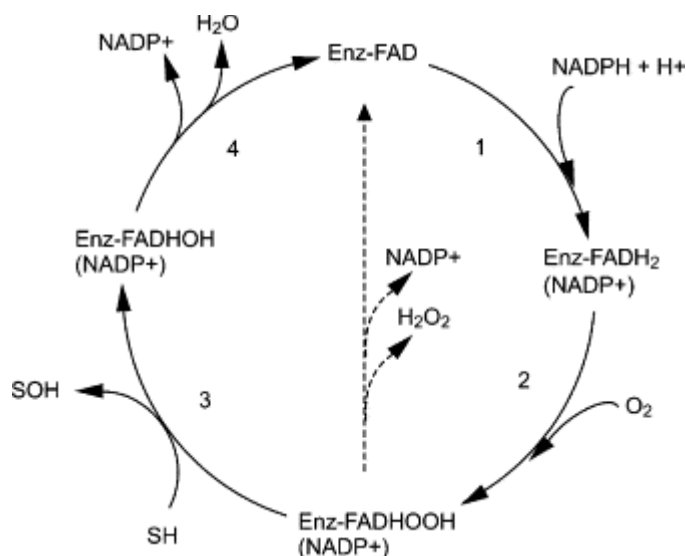
Protože existuje mnoho izoform cytochromu P450, byla pro tuto superrodinu hemových proteinů zavedena systematická nomenklatura na základě shody sekvence aminokyselin mezi jednotlivými izoformami. Izoformy, jejichž sekvence aminokyselin se shoduje z více než 40 %, jsou řazeny do stejné rodiny, z více než 55 % do stejné podrodiny. Příslušnost k jednotlivým rodinám či podrodinám udává písmeno respektive číslice za označením CYP (Clementi a Fumagali, 2012).

Pro oxidační reakce je důležitá přítomnost molekuly kyslíku O_2 , nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH), NADPH cytochrom P450 reduktázy a samotného cytochromu. Substrát se váže na atom Fe^{3+} hemu za tvorby komplexu substrát - enzym. V dalším kroku dochází k redukci železitého iontu na železnatý vlivem elektronu poskytnutého NADPH-cytochrom P450 reduktázou. Redukovaný komplex substrát - enzym je schopný přijmout molekulu kyslíku O_2 a další elektron z NADPH-cytochrom P450 reduktázy. Jeden atom kyslíku je použit na tvorbu oxidovaného produktu a druhý na syntézu molekuly vody. Reakci lze vidět na Obr. 2 (Clementi a Fumagali, 2012).



Obr. 2: Katalytický cyklus cytochromu P450. RH představuje metabolisovanou látku, ROH metabolit. Převzato z: Belcher et al. 2014

FMO představují další důležitý enzym podílející se na biotransformaci molekul. U savců rozlišujeme 5 typů FMO (FMO_1 - FMO_5), z nichž FMO_1 a FMO_3 jsou nejvýznamnější izoformy vyskytující se v játrech. FMO_2 se vyskytuje v plicích primátů s výjimkou lidí a FMO_4 či FMO_5 se objevují jen velmi vzácně. Katalytický cyklus začíná v prvním kroku redukcí prostetické skupiny FAD na $FADH_2$ za pomoci kofaktoru NADPH. Následuje navázání molekuly kyslíku za vzniku 4α -hydroperoxyflavinu ($FAD-OOH$). V přítomnosti substrátu dochází k navázání substrátu na komplex $FAD-OOH$ a oxidaci substrátu za uvolnění molekuly vody (Eswaramoorthy et al. 2006). Proces je schematicky znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3: Katalytický cyklus FMO. SH označuje metabolisovanou látku, SOH příslušný metabolit. Převzato z: Zhang a Robertus 2002

Na rozdíl od cytochromů mají FMO výhodu v tom, že nepodléhají tak snadno indukci či inhibici léčivy. Mezi léčiva metabolisována tímto oxidačním systémem patří H₂ inhibitory, klopazin nebo itoprid (Clementi a Fumagali, 2012).

EH jsou enzymy, které katalyzují přeměnu epoxidů na dihydrodioly. Vzhledem k reaktivitě těchto sloučenin EH chrání organismus před vazbou epoxidů na nukleofilní části proteinů, DNA a zabraňuje tak tvorbě mutací či buněčné toxicitě.

Redukce

Xenobiotika mohou podléhat v organismu také redukci, která je však méně častou reakcí první fáze biotransformace. Setkáváme se s ní nejvíce u bakterií střevní mikroflóry. Příklad redukce představuje přeměna prontosilu na účinnou antibakteriální složku sulfanilamid (Gibson a Skett, 1994). Z chemických reakcí, řadících se do tohoto typu metabolické přeměny, se jedná především o nitro- nebo azo- redukce. Redukcí nitro- i azo- skupiny vznikají sloučeniny typu aminů (Lee et al. 1996). Za redukci jsou zodpovědné enzymy z rodiny aldoketoreduktáz, reduktázovou aktivitu mají ale i cytochromy (Lee a Zhu, 2011).

Hydrolyzáza

Vzhledem k tomu, že mnoho xenobiotik obsahuje ve své molekule esterové či amidové vazby, dochází často během první fáze biotransformace k hydrolyzáze těchto vazeb a vzniku příslušných kyselin a příslušných alkoholů či aminů. V tkáních je obsaženo velké množství nespecifických esteráz lokalizovaných v cytoplazmě.

Esterázy můžeme rozdělovat do 4 skupin. První skupinou jsou arylesterázy štěpící estery v blízkosti aromatických cyklů, druhou karboxyesterázy dělící estery v alifatických řetězcích, třetí cholinesterázy, které štěpí molekulu, jejíž alkoholovou složku představuje cholin a čtvrtou acetylerázy, ve kterých je kyselou složkou štěpených esterů kyselina octová. Amidázy mají odlišný mechanismus biochemického štěpení substrátu a oproti esterázám štěpí molekuly pomaleji (Clementi a Fumagali, 2012, Lee et al. 1996).

3.1.2 II. FÁZE BIOTRANSFORMACE LÉČIV

Během druhé fáze biotransformace dochází ke vzniku konjugátu endogenní sloučeniny s produktem I. fáze biotransformace za vzniku polárnější sloučeniny. Mezi tyto endogenní sloučeniny patří například kyselina glukuronová, sírová, glutation či aminokyseliny. V některých případech může konjugát vznikat i z původního léčiva bez nutnosti podstoupení první fáze biotransformace (Lee et al. 1996).

Glukuronidace

Glukuronidace je vůbec nejčastěji zastoupenou reakcí druhé fáze biotransformace. Substrátem pro reakci mohou být alifatické i aromatické alkoholy, karboxylové kyseliny či primární, sekundární, terciární i kvarterní aminy. Enzymem katalyzujícím tento typ reakcí je uridindifosfát-glukuronosyl-transferáza (UGT) využívající ke konjugaci glukuronovou kyselinu jako kofaktor (Lee a Zhu 2011). Příkladem léčiva, které ve druhé fázi biotransformace podléhá glukuronidaci, je morfin. Vzniká morfin-6-glukuronid, který má v porovnání s morfinem pomalejší nástup účinku, ale delší trvání a méně často u něj probíhají nežádoucí účinky v podobě gastrointestinálních obtíží (Dorp et al. 2008).

Sulfatace

Druhou nejčastější reakcí druhé fáze biotransformace je sulfatace. Molekula léčiva podléhající sulfataci zpravidla obsahuje hydroxylovou skupinu, hydroxylamin či aminovou skupinu. Sulfatace probíhá díky řadě enzymů označovaných jako sulfotransferázy (SULT) a to pouze za přítomnosti kofaktoru 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfátu (PAPS). Do molekuly léčiva je reakcí zavedena sulfonová skupina $-SO_3H$.

Acetylace

Acetylace je další reakce druhé fáze biotransformace, která probíhá u molekul strukturního typu primárních aminů nebo hydrazinů za vzniku acetylovaných *N*-sloučenin původní látky. Na procesu se podílí enzymy *N*-acetyltransferázy (NAT) za přítomnosti Acetylu-CoA jako kofaktoru.

Methylace

S methylací se můžeme setkat u struktur obsahující katechol nebo thiol. Podle strukturního typu rozlišujeme enzymy, které reakci katalyzují, na katechol-*O*-methyltransferázu nebo thiolmethyltransferázu. Všechny methyltransferázy využívají k reakci *S*-adenosylmethionin jako kofaktor. Reakcí vznikají methylované deriváty parentní látky, kdy dochází k vazbě skupiny CH₃ do molekuly buď přes kyslík v případě katechol-*O*-methyltransferázy nebo přes síru u thiolmethyltransferázy. Ačkoli methylace nepatří mezi časté cesty biotransformace, hraje v metabolismu léčiv významnou roli. Je to z důvodu častých polymorfismů v enzymech, což může mít za následek zásadní ovlivnění terapie pacienta.

Konjugace glutathionu

Tato reakce druhé fáze biotransformace probíhá většinou na epoxidech, karbonylových skupinách či heteroatomech. Glutathion je tripeptid sestávající z aminokyselin glutamátu, cysteinu a glycinu, který se za pomoci katalýzy enzymem glutathion-*S*-transferázy (GST) začleňuje do parentní struktury léčiva (Clementi a Fumagali, 2012, Lee et al. 1996).

3.1.3 *IN VITRO* METODY METABOLISMU

Během vývoje a výzkumu léčiv se v preklinické fázi využívají jak *in vitro*, tak *in vivo* farmakokinetické metody. Vzhledem k obsahu této práce se dále zaměřím pouze na *in vitro* metody studia biotransformace. Díky těmto metodám získáváme základní informace o biotransformaci léčiva, stabilitě potenciálních léčiv v organismu, schopnosti parentní látky či jejích metabolitů inhibovat enzymy cytochromálního systému či o schopnosti látky produkovat reaktivní metabolity. Tyto poznatky mohou být uplatněny v predikci chování léčiva v organismu a predikci potenciálních lékových interakcí s dalšími léčivy (Brandon et al. 2003). Aby mohl být sledován osud léčiva v organismu, je potřeba využívat vhodné a validované postupy měření. Nejčastějším

postupem u metabolických studií je příprava vzorku následována oddělením jednotlivých metabolitů a léčiva z matrice a nakonec jejich detekce vhodnou detekční technikou (Holčapek et al. 2008). Mezi detekční techniky, které jsou schopné odhalit chemickou strukturu metabolitů, se řadí předně hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonance (NMR) (Kruk et al. 2017). K metodám analýzy *in vitro* metabolismu se často využívají zvířecí nebo lidské jaterní mikrosomy. Důležitým faktorem pro správný výsledek biotransformace je aktivita jaterních enzymů, které byly použity v *in vitro* modelech (Fisher et al. 2001). Výsledky těchto testů bývají rozhodující pro výběr *in vivo* modelů a další testování. Mezi *in vitro* modely řadíme studie provedené se supersomy, mikrosomy, cytosolem, S9 frakcí, buněčnými liniemi, transgenomovými buněčnými liniemi, jaterními buňkami, jaterními řezy a perfundovanými játry (Brandon et al. 2003).

Lidské jaterní mikrosomy

Lidské jaterní mikrosomy (HLM) jsou nejvíce prozkoumaným a nejoblíbenějším *in vitro* modelem a byly také použity v této práci. Jedná se o vezikuly endoplazmatického retikula hepatocytů a bývají připravovány frakční centrifugací. Obsahují nejčastěji CYP, FMO a UGT (Plant et al. 2004). Důležitým parametrem je aktivita těchto enzymů, která bývá deklarována jejich dodavatelem. Vzhledem k tomu, že enzymatická aktivita je u každého jedince individuální, připravují se s výhodou tzv. pooled mikrosomy, obsahující mikrosomy z reprezentativní části populace. K zajištění dostatečného množství kofaktorů potřebných při metabolických reakcích je nutné přidat NADPH regenerační systém (Plant et al. 2004).

Supersomy

Supersomy jsou mikrosomy získané rekombinantně z hmyzích buněk infikovaných baculovirem a exprimující lidské cytochromy i UGTs. Jsou považovány za možnou náhradu lidských jaterních mikrosomů v *in vitro* modelech. V této metodě musí být vždy přítomný kontrolní vzorek samotných hmyzích buněk neobsahujících výše zmíněné enzymy. Supersomy vykazují větší enzymatickou aktivitu než jiné mikrosomy, a z tohoto důvodu se využívají zvláště při studiu pomalu se metabolisujících léčiv (Brandon et al. 2003).

Cytosolové frakce lidských jater

Cytosolová frakce se získává diferenciální centrifugací homogenizovaných jater, přičemž obsahuje enzymy figurující především v druhé fázi biotransformace jako je *N*-acetyl transferáza, glutathion-S-transferáza či sulfotransferáza. K jejich aktivaci je nutné přidat exogenní faktory například glutathion či acetyl koenzym A (Brandon et al. 2003).

Lidská jaterní S9 frakce

Tento *in vitro* model obsahuje mikrosomální i cytosolické frakce homogenizovaných jater. Stejně jako u obou předchozích je i u tohoto modelu vyžadováno přidání aktivačního systému, v tomto případě obojího (NADPH regeneračního systému i exogenních faktorů). Těto metody bývá nejčastěji využíváno pro detekci mutagenity chemikálií společně s Amesovým testem (Anonym 1980). Jelikož mutagenita některých léčiv se projevuje až na úrovni metabolitů, je nutno tento test provádět nejen pro samotné molekuly potenciálních léčiv, ale i po jejich metabolismu. Výhodou tohoto modelu je možnost vyhodnocení první i druhé fáze biotransformace současně, to však na úkor nižší aktivity příslušných enzymů v porovnání s předchozími metodami (Brandon et al. 2003).

Jaterní nádorové buněčné linie

Jaterní nádorové buněčné linie mohou být izolovány z parenchymatického tumoru jaterního. Základním požadavkem pro tento model je korespondence s normální fyziologickou funkcí hepatocytů *in vivo*. Na rozdíl od výše zmíněných modelů se netěší velké popularitě vzhledem k nereprezentativní škále enzymů v jednotlivých liniích. Rozlišujeme několik typů buněčných linií, některé z nich se však díky velmi nízké expresi enzymů k metabolickým studiím téměř nepoužívají. K biotransformačním studiím se využívá především buněčné linie HepG2 (human liver hepatocellular carcinoma cell line – lidské buňky hepatocelulárního karcinomu). Modernější přístup představují buněčné linie připravené rekombinantně (Brandon et al. 2003).

Hepatocyty

Hepatocyty neboli jaterní buňky jsou dalším modelem využívaným při *in vitro* metabolismu. Izolace hepatocytů může probíhat buď disociací jaterního parenchymu, nebo enzymatickým působením a následnou separací uvolněných jaterních buněk (Puviania et al. 1998). Dle Howarda et al. 1967 lze hepatocyty izolovat inkubací jater s kolagenázou a hyaluronidázou. Po izolaci zůstávají hepatocyty metabolicky aktivní

několik hodin (Puviania et al. 1998). Výzkum a vývoj se nyní zabývá i dalšími modely kultur hepatocytů, jako je sendvičový model hepatocytů, trojrozměrná tištěná jaterní tkáň anebo do budoucna zamýšlený mikrofyziologický systém neboli tzv. orgán na čipu (Tetsuka et al. 2017).

Jaterní řezy

Jaterní řezy byly dlouho neoblíbeným modelem studia metabolismu a nebyly široce využívány. Nezáměr pramenil zvláště z náročnosti vytvoření uniformních řezů, které byly nezbytně nutné pro poskytnutí reprodukovatelných výsledků (Parrish et al. 1995). S vývojem nových technologií je možné připravit ultratenké řezy o definované tloušťce, a model se tak řadí k běžně využívaným metodám. Jejich nevýhodou je relativně krátká doba aktivních enzymů čítající přibližně 48 hodin a možnost využití řezů pouze ze zvířecích jater (Brandon et al. 2003).

Perfundovaná játra

Model využívající perfundovaných jater nebývá v praxi téměř vůbec využíván, ale přesto byl v historii častokrát studován a v některých případech se s ním lze setkat i dnes. Důvodem jsou mnohé nevýhody v podobě krátké enzymatické aktivity, nereprodukovatelnosti či využívání jater pouze z malé škály zvířecích zástupců. Vzhledem k zachování integrity a orgánu jako celku je tento model nejbližší podmínkám *in vivo* (Brandon et al. 2003).

3.2 ALZHEIMEROVA CHOROBA

Tato diplomová práce se zaměřuje na metabolickou studii léčiva K1277, které se jeví jako slibné potenciální léčivo Alzheimerovy nemoci, a z toho důvodu bude v následující kapitole toto neurodegenerativní onemocnění krátce popsáno.

Alzheimerova choroba, diagnostikována poprvé v roce 1906 Aloisem Alzheimerem, patří mezi nejčastější neurodegenerativní onemocnění vedoucí k demenci (Alzheimer 1907, Jouanne et al. 2017, Toledo et al. 2017). Neurodegenerativní onemocnění se projevují progresivní degenerací a úbytkem neuronů ve specifických oblastech mozku (Stříteský et al. 2001, Mačák et al. 2012). Demence představuje skupinu onemocnění charakterizovanou změnou kognitivních funkcí, poruchami osobnosti, chování a společenského začlenění (Vlček et al. 2010).

3.2.1 TYPY ALZHEIMEROVY CHOROBY

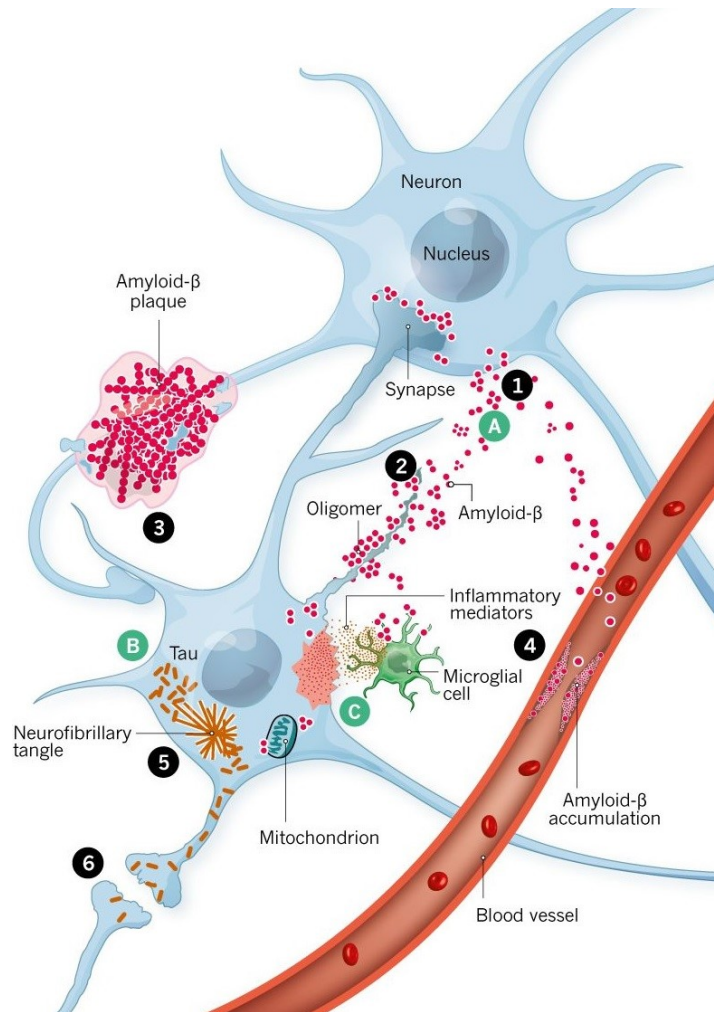
Rozlišují se dvě formy Alzheimerovy choroby (AD) – hereditární a sporadická. Hereditární forma AD (5 - 10 % případů AD) je charakterizována manifestací symptomů v časnějším stádiu života a bývá geneticky podmíněná některou ze vzácných genetických mutací (Jouanne et al. 2017). Jedná se o mutaci v genu pro amyloidový prekursorový protein (APP) na chromozomu 21. Jeho lokace byla objevena na základě příznaků připomínající AD u pacientů s trisomií 21. chromosomu neboli Downovým syndromem. Dále se jedná o mutaci genu pro presenilin 1 (PSEN - 1) na chromozomu 14, který je součástí γ -sekretázy a mutaci v genu pro presenilin 2 (PSEN -2) na chromozomu 1, který je klíčovou složkou γ -sekretázy. Tyto mutace se dědí autozomálně dominantně (Felician a Sandson, 1999).

Častější, sporadická forma (90 - 95 % případů AD) vyskytující se po 65. roku života, bývá projevem mnoha činitelů environmentálního, genetického i epigenetického původu (Jouanne et al. 2017). Mezi environmentální faktory je možné řadit věk, psychickou aktivitu, kouření, alkohol či poranění hlavy (Tang et al 1996, Koukolík a Jiráček 1998). Z genetických predispozic se jedná zvláště o mutaci v genu pro apolipoprotein E (APO-E), a to konkrétně o mutaci jedné z jeho hlavních alel - E4, která je spojována s vyšším výskytem této formy AD. Pravděpodobně se apolipoprotein - E4 podílí na poškození plasticity synapsí a na atrofii hippocampu. Je také asociován s vyšším výskytem neurofibrilárních klubek a senilních plaků (Bar et al. 2018).

3.2.2 PATOFYZIOLOGIE ALZHEIMEROVY CHOROBY

Častým patologickým *post mortem* nálezem na mozku u pacientů s AD jsou senilní plaky, u nichž je pro AD charakteristická zvláště jejich četnost a hustota výskytu v neokortexu (Silbernagl a Lang 2012, Mačák et al. 2012). Vznikají agregací monomerů amyloidu β a dalších složek (proteoglykany, α -1 antichymotrypsin, APO-E) a vyskytují se extracelulárně (Jouanne et al. 2017, Silbernagl a Lang 2012). β amyloid je toxický nerozpustný fragment o 40 - 42 aminokyselinách vznikající z APP patologickým štěpením β -sekretázou a γ -sekretázou (Lee et al. 2017). Za fyziologických podmínek se na štěpení podílí nejvíce α -sekretáza, jejímž štěpením vznikají krátké plně solubilní varianty amyloidu β , které hrají významnou roli při tvorbě nových neuronálních synapsí (Jiráček 2008).

Dalším histopatologickým nálezem u pacientů s Alzheimerovou chorobou jsou neurofibrilární klubka (NFT) složená z hyperfosforylovaného proteinu τ (Jones et al. 2017). Protein τ je hlavním představitelem mikrotubuly asociovaných proteinů (MAPs) stabilizující mikrotubuly, které zastávají jednu ze tří základních složek cytoskeletu a které se podílejí na neuronálním transportu. Stabilita mikrotubul je regulována stupněm fosforylace proteinu τ , která je zajišťována různými enzymy, jako je například glykogen syntáza kináza 3 (GSK3), cyklin dependentní protein kináza 5 (CDK5) nebo mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK). Klíčovým enzymem pro vznik hyperfosforylovaného proteinu τ je výše zmíněná GSK3- β . V patologickém procesu dochází u proteinu τ k rozdílným posttranslačním úpravám jako je glykosylace, nitrace nebo hyperfosforylace. Posttranslačními úpravami dochází k změnám konformace proteinu, které vedou k neschopnosti vazby na mikrotubuly a k následné agregaci fosforylovaných proteinů τ (Jouanne et al. 2017). Oba patologické jevy spojené s tvorbou β amyloidu a hyperfosforylovaného proteinu τ lze vidět na Obr. 4.

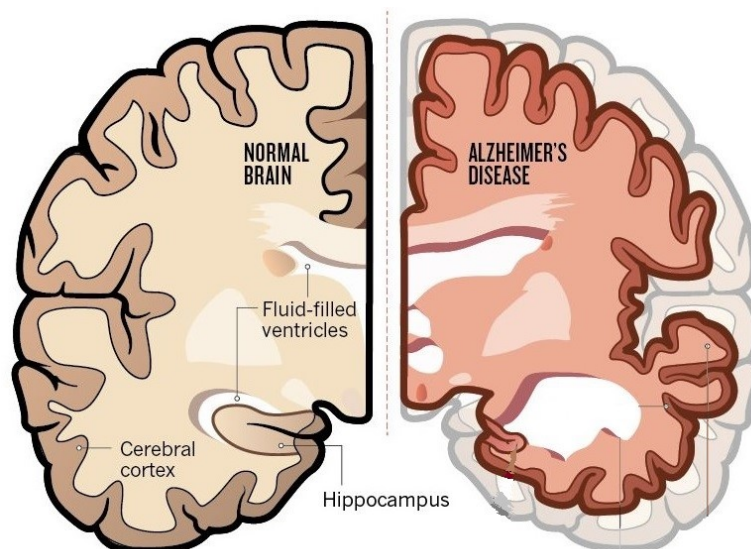


Obr. 4: Patofyziologické znaky AD u pacientů s AD. Převzato z: Drew 2018

Při AD bývá poškozeno více biochemických drah. Mimo porušeného metabolismu amyloidu β a proteinu τ , má na progresi AD značný vliv oxidační stres, různé mitochondriální dysfunkce nebo rozvoj zánětu (Toledo et al. 2017). Postup patologických lézí a poškození neuronů se pohybuje od neokortexu do hipokampu a korových oblastí až po mozeček (Jouanne et al. 2017). AD ovlivňuje také systémy některých neurotransmiterů. Cholinergní systém je poškozován nejdříve, dochází k úbytku enzymu acetylcholintransferázy zodpovědné za syntézu acetylcholinu (ACh) a bývá také omezeno zpětné vychytávání cholinu ze synaptické štěrbin. Dalším poškozeným systémem je glutaminergní systém, kdy naopak nastává nadměrné uvolňování glutaminu a snížení jeho re-uptaku v nejvíce postižených částech mozku. Vyšší množství glutamátu se projevuje nadměrnou vazbou na různé receptory například na ionotropní *N*-metyl-*D*-aspartátové receptory (NMDA receptory), což má za následek nadměrné otevření vápenatých kanálů a přílišný vstup kalcia do buněk a dále aktivaci

kaskády dějů vedoucí k patologickým jevům a v konečné fázi k neuronální apoptóze (Jirák 2009).

Makroskopicky je mozek pacientů s AD atrofický. Gyry mozkové jsou zúžené, rýhy a komory rozšířené a atrofický mozek může dosahovat velmi nízké váhy kolem 900 g (Silbernagl a Lang 2012). Rozdíly mezi zdravým mozkem a mozkem pacientů s AD jsou vidět na Obr. 5.



*Obr. 5: Rozdíly v makroskopické stavbě mozku u zdravých lidí (vlevo) a pacientů s AD (vpravo)
Modifikováno dle: Drew 2018*

S postupným poškozováním jednotlivých částí mozku a ubývání neuronů daných oblastí dochází ke specifickým projevům AD (Jouanne et al. 2017).

3.2.3 KLINICKÝ OBRAZ

Onemocnění začíná pomalými, plíživými výpadky paměti, nedbalostí v péči o sebe, chybnými rozhodnutími (Silbernagl a Lang 2012). Pro poruchy paměti je typické, že nejdříve bývá poškozena epizodická paměť, na jejíž správné funkci se podílí hippocampus (Jirák 2008). S postupujícím zánikem neuronů se dále zhoršuje procedurální i dlouhodobá paměť a postupně vyúsťuje v motorické výpadky, jako jsou poruchy řeči, ataxie či myoklonismus (Silbernagl a Lang 2012). V těžším stádiu demence bývá pacient dezorientován místně i časově a vyžaduje celodenní dohled. V nejtěžším stádiu choroby se vyskytuje úplná dezorientace, neschopnost rozpoznat své blízké i sebe a často následuje upoutáním na lůžko. Smrt zpravidla nastane vlivem infekce (pneumonie), úrazu či poranění (Vlček et al. 2010).

3.2.4 DIAGNÓZA

V raném stádiu je důležitá včasná a správná diagnóza a diferenciální odlišení choroby například od benigní zapomnětlivosti stárnoucích osob nebo od mírné kognitivní poruchy (Vlček et al. 2010). K tomu může dopomoci pečlivě zjištěná anamnéza, fyzikální i testovací metody. Jako screeningový test bývá nejčastěji používán krátký test kognitivních funkcí (MMSE) nebo test kreslení hodin. Žádný z těchto testů není plně specifický, proto se s výhodou používají složitější testy kognitivních funkcí, především Alzheimer disease assessing scale - cognitive subscale (ADAS - cog). Diagnosticky důležitý je také samotný průběh a projevy demence (Jirák 2008). Mezi podporující nálezy patří přítomnost mediálně temporální atrofie vzniklé v důsledku snížení objemu hippocampu, entorhinálního cortexu a amygdaly prokazatelná metodou magnetické rezonance (MRI). Významná je taktéž abnormální přítomnost biomarkerů v mozkomíšním moku. Jedná se o nízkou koncentraci amyloidu β , vyšší koncentrace celkového τ proteinu, nebo zvýšenou koncentraci fosforylovaného proteinu τ . Dalšími diagnostickými prvky mohou být průkaz autozomálně dominantních mutací v rodině nebo nálezy na molekulárním zobrazení mozku pomocí pozitronové emisní tomografie (PET). Tato metoda identifikuje shluky β -amyloidu pomocí protilátky označované jako pittsburská substance b nebo prokazuje hypometabolismus pomocí značené fluorodeoxyglukózy v temporálních a parietálních lalocích (Jirák 2011).

3.2.5 LÉČBA

Cíl léčby AD se odlišuje v jednotlivých stádiích nemoci. V počátečních stádiích je snaha o zlepšení kognitivních funkcí nebo alespoň o jejich stabilizaci. V pokročilejších fázích je cílem zpomalení progresu onemocnění a v závěru nemoci paliativní péče pro pacienta i jeho rodinu (Vlček et al. 2010).

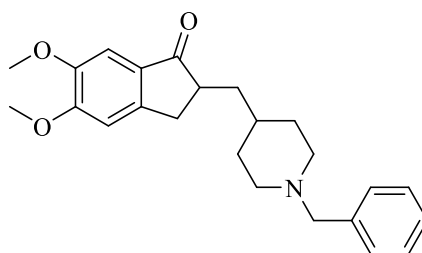
O vzniku nemoci bylo vytvořeno několik teorií, na jejichž základě je postavena dosavadní strategie léčby AD. První z teorií je cholinergní hypotéza, která asociuje pokles koncentrace mediátoru acetylcholinu v CNS s projevy nemoci. Dle této teorie se do praxe zavedly inhibitory acetylcholiesterázy (AChE), enzymu, který je zodpovědný za odbourávání acetylcholinu v synapsích. Druhou teorií je teorie β -amyloidu a s ní související zkoumané látky jako inhibitory β - a γ -sekretázy. Třetí teorie řadí AD mezi metabolické choroby způsobené nezdravým způsobem života. AD je tak označována

jako diabetes mellitus 3. typu, vzhledem k souvislosti se sníženou citlivostí mozku na inzulin (Doležal 2013).

Inhibitory Acetylcholinesterázy

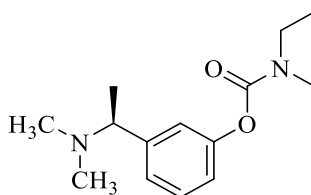
K léčbě mírné až středně závažné AD se používají inhibitory AChE (Walker a Rosen 2006) zvyšující koncentraci neuromediátoru acetylcholinu, který je tak k dispozici pro přenos nervového vzruchu v centrální nervové soustavě (CNS), inhibicí acetyl- nebo butyryl-cholinesterázy (Romero et al. 2013). První látkou, u které byly zjištěny účinky spojené s inhibicí acetylcholinesterázy, byl fyzostigmin. Pro své nežádoucí účinky a nízký terapeutický index ale nebyl registrován. Prvním registrovaným léčivem působící inhibicí AChE i butyrylcholinesterázy (BChE) byl takrin (Mehta et al 2012). I u tohoto léčiva byly po čase objeveny závažné nežádoucí účinky, a byl proto z trhu stažen. Závažným nežádoucím účinkem byla hepatotoxicita, dalšími nežádoucími účinky pak nevolnost, zvracení, průjem či motání hlavy (David a Powchik, 1995). Vzhledem ke krátkému biologickému poločasu a dávkování čtyřikrát denně byl často problém i s compliance pacienta. Dle Farlow et al. 1992 byl však takrin léčivem, které vykazovalo po 12 týdnech v dávce 80 mg denně výrazné zlepšení v kognitivních ADAS-cog testech ve srovnání s placebem v kontrolované dvojité zaslepené studii, a je proto v modifikované podobě nadále předmětem výzkumů. V současné době jsou používána tři léčiva s tímto mechanismem účinku, a to donepezil, rivastigmin a galantamin.

Mezi nejúčinnější centrální inhibitory patří donepezil, který je nekompetitivním inhibitorem AChE (Mehta et al. 2012). Burns et. al 1999 uvedli, že v porovnání s placebem zaznamenal donepezil signifikantní zlepšení kognitivních funkcí v randomizované, dvojité zaslepené, placebem kontrolované studii. Předpokládá se, že donepezil působí vedle inhibice AChE i dalšími mechanismy účinku. Velmi dobře se absorbuje, je metabolisován jaterními cytochromy a má dlouhý biologický poločas v plazmě, cca 70 hodin (Mehta et al. 2012). Jeho struktura je znázorněna na Obr. 6.



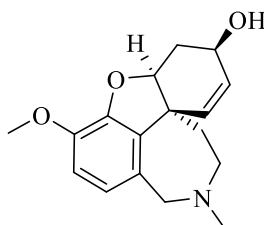
Obr. 6: Chemická struktura donepezilu

Dalším z používaných inhibitorů AChE je kompetitivní inhibitor rivastigmin. Účinkuje inhibičně i na BChE a od roku 2000 je používán i v léčbě Parkinsonických demencí. U perorálních forem se objevily nežádoucí účinky na gastrointestinální trakt. Z tohoto důvodu byly na trh zavedeny transdermální náplasti s rivastigminem, u kterých je tento nežádoucí účinek omezen. Metabolisován je pomocí cholinesteráz a jenom minimálně systémem cytochromů, jeho výhodou je tak nízký interakční potenciál s ostatními léčivými. Jedná se o malou molekulu a její struktura je znázorněna na Obr. 7 (Mehta et al. 2012).



Obr. 7: Chemická struktura rivastigminu

Posledním používaným AChE inhibitorem je galantamin. Vedle inhibice AChE zesiluje účinek acetylcholinu (ACh) na nikotinové receptory. Jeho výhodou je dobrá absorpce po perorálním podání, biologický poločas trvá asi 7 hodin. Můžeme u něj ale pozorovat nežádoucí účinky na gastrointestinální trakt působením na periferní nervovou soustavu a ukládání v tukové tkáni. Jeho struktura je vyobrazena na Obr. 8.



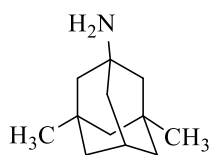
Obr. 8: Chemická struktura galantaminu

Mezi dalšími inhibitory AChE, které ale z různých důvodů nebyly uvedeny na trh, lze jmenovat například phenserine, tolserine, esolinerine nebo tesofensine (Mehta et al.

2012). Mezi inhibitory AChE patří také přírodní látka huperzin A. Jedná se o vysoce specifický a reverzibilní inhibitor AChE, který vykazuje lepší prostupnost přes hematoencefalickou bariéru (HEB), vyšší biologickou dostupnost a delší dobu působení v porovnání s léčivy užívanými v ČR (Wang et al. 2006). Všechny inhibitory AChE jsou kontraindikované při gastroduodenální vředové chorobě a při těžších převodních poruchách srdce. Účinnost inhibitorů by měla být posuzována nejdříve po 3 měsících uplynulé léčby. Při intoleranci nebo neúčinnosti této léčby je doporučováno převedení na jiný inhibitor nebo na léčivo používané při těžších stádiích nemoci, například memantin. Podkladem pro změnu léčby jsou i výsledky screeningového testu MMSE (Jirák 2009).

Inhibitory NMDA receptorů

Při pokročilejším stádiu AD se uvolňuje nadměrné množství excitačních aminokyselin jako je aspartát či glutamát do synaptické štěrbině vyvolávající hyperexcitaci NMDA receptorů. Zvýšená excitotoxicita bývá spojována s neurotoxickým účinkem. Bývá porušen základní mechanismus učení a také bývá spuštěna kaskáda dějů vedoucích až k apoptóze neuronů. Příkladem léčiva, které svou vazbou na receptor brání aktivaci NMDA receptorů, je memantin. Podává se perorálně v denní dávce 20 mg, kterou je nutné postupně titrovat od počáteční dávky 5 mg. Jedná se o dobře tolerovanou látku, u které se ale mohou, zvláště na začátku terapie, vyskytovat některé nežádoucí účinky jako je závrať, nespavost nebo průjem (Molino et al. 2013). Struktura memantinu je znázorněna na Obr. 9.



Obr. 9: Chemická struktura memantinu

Další strategie léčby

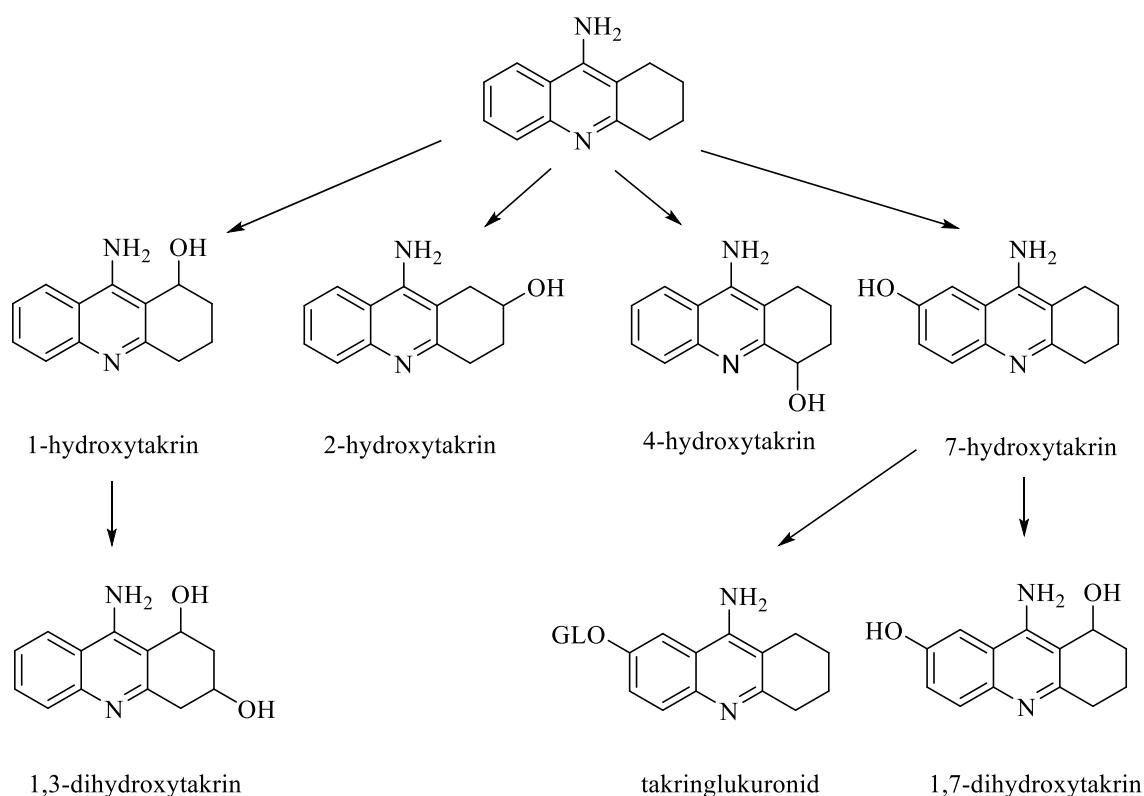
Vzhledem k absenci léčby, která by dokázala AD vyléčit, se zájem ubírá k vývoji nových léčiv, která by ovlivňovala některý z molekulárních cílů hrající důležitou roli v patogenezi AD. Výzkum se intenzivně zaměřuje na patogenezi amyloidu β , neboť je předpoklad, že jeho změny jsou prvními patologickými projevy u začínající neurodegenerace. Zkoumají se vakcíny a protilátky proti amyloidu β a inhibitory či modulátory γ - a β -sekretázy. U první vakcíny zkoušené u lidí byla odhalena toxicita

a její přínos nebyl klinicky významný. Oproti tomu jsou ve třetí fázi klinického hodnocení zkoumány další vakcíny jako CAD106, ACC-001 a protilátky proti amyloidu β : solanezumab, gantenerumab, crenezumab a aducanumab. Dalším zkoumaným cílem je γ -sekretáza. U inhibitorů tohoto enzymu avagacestatu a semagacestatu byla zjištěna závažná toxicita a klinické hodnocení bylo ukončeno. U β -sekretázy, která je také cílem terapie AD, je mnoho látek v klinickém hodnocení. Jedná se opět o inhibitory tohoto enzymu a léčivem, které je zatím nejdále v klinickém hodnocení, je verubecestat. Dalším směrem vývoje léčiv jsou substance, které příznivě ovlivňují metabolismus proteinu τ . Mechanismem účinku zkoumaných léčiv je především redukce hyperfosforylace proteinu τ inhibicí enzymu GSK3- β (Winblad et al. 2016). Vzhledem k faktu, že AD je multifaktoriální onemocnění, trendem výzkumu léčiv proti AD je opouštění od designu jedné molekuly ovlivňující jeden cíl k terapii multiple-medication therapy (MMT), kde se využívá kombinace léčiv působících různými mechanismy účinku. V léčbě AD je takto využívána například kombinace inhibitoru AChE a memantinu. Podobným přístupem je terapie multiple - compound medication (MCM), kdy jsou daná léčiva s různým mechanismem účinku inkorporována do jedné lékové formy. Tato strategie vede k usnadnění dávkování a zlepšení compliance pacienta. Ještě novějším přístupem v léčbě multifaktoriálních onemocnění je přístup multi - target - directed ligands (MTDL). Jedná se o metodu, při které jsou různá léčiva kombinována do jedné struktury za vzniku takzvaného hybridu. Toto spojení má za cíl optimalizovat jednu chemickou strukturu pro ovlivnění více biologických cílových molekul najednou. V léčbě AD se tato strategie uplatňuje především u inhibitorů AChE v kombinaci s dalšími strukturami, jako jsou například inhibitory agregace amyloidu β , inhibitory monoaminoxidázy či antioxidanty (Cavalli et al. 2008, Vykoukalová 2017). V této práci byl použit hybrid vzniklý spojením 6-chlortakrinu a aminokyseliny tryptofanu. Dalšími z hybridů takrinu je například merkaptotakrin, 7 -MEOTA, takrin kombinovaný s melatoninem, troloxem, kumarinem, chinolinem, kyselinou kávovou či donepezil-takrin heterodimer (Spilovska et al. 2017). Důvodem pro tento přístup je zvláště snaha o zachování účinku takrinu při omezení jeho nežádoucích účinků (Romero et al, 2013).

3.2.6 METABOLISMUS TAKRINU A ODVOZENÝCH STRUKTUR

Metabolismus takrinu hraje v toxicitě tohoto léčiva jednu z nejdůležitějších farmakologických rolí. Na biotransformaci se podílejí jaterní enzymy, převážně izoforma cytochromu CYP1A2. Biologická dostupnost takrinu po perorálním podání se

pohybuje kolem 17 % (PubChem Compound Database, 2005) a biologický poločas tak dosahuje maximálně 4 hodin. V první fázi biotransformace takrinu vznikají převážně jeho mono- a di-hydroxyderiváty. Jedním z přednostně vznikajících metabolitů takrinu je 1-hydroxytakrin, zvaný velnacrine, který obdobně jako takrin vykazuje inhibiční aktivitu vůči AChE. Z dalších monohydroxymetabolitů takrinu lze jmenovat 2-hydroxytakrin, 4-hydroxytakrin či 7-hydroxytakrin. Dihydroxymetabolity mají hydroxylovou skupinu navázanou v polohách 1, 7 nebo 1, 3. Přehled metabolitů první fáze biotransformace a strukturu takringlukuronidu (tj. metabolit druhé fáze metabolismu) je možné vidět na Obr. 10.



Obr. 10: Schéma metabolismu takrinu. Převzato z: Patočka et al. 2008

Nevýhodou a důvodem pro stažení tohoto léčiva z trhu byla tvorba vysoce reaktivních molekul oxidační bioaktivací. Reaktivní sloučeniny se dokázaly vázat konjugovanými vazbami na makromolekulární cíle v tkáních, jako jsou proteiny či DNA, a danou tkáň poškozovat. V tomto ohledu je důležité zmínit především 7-hydroxytakrin, který je považován za nejvíce toxický metabolit takrinu (Patočka et al. 2008).

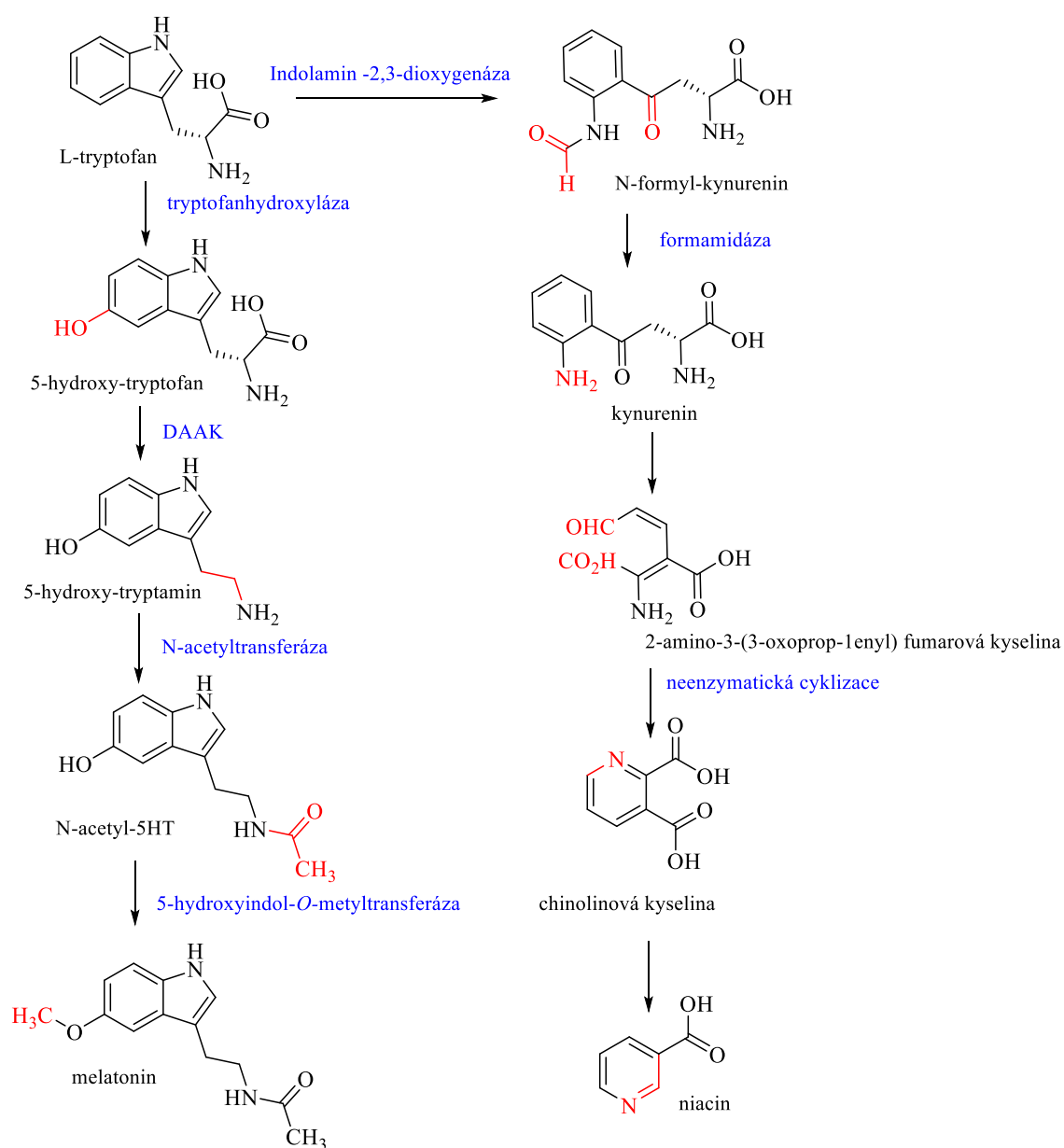
Z metabolismu takrinových hybridů zde uvádím pro představu metabolismus 6–chlortakrin–troloxu, který se dle Nepovimové et al. 2015 metabolisuje na 4 hlavní metabolity. Studie byla provedena s lidskými poolovanými jaterními mikrosomy a metabolity 6–chlortakrinu-troloxového hybridu byly stanoveny pomocí LC-MS/MS po jednohodinové inkubaci v mikrosomálním prostředí při 37 °C. První a nejintenzivnější metabolit představoval hydroxylovaný a oxidovaný produkt, druhý dihydroxyderivát parentní látky. Třetí a čtvrtý metabolit vznikly rozštěpením molekuly a následnou oxidací na alkohol v případě metabolitu 3 nebo oxidací na karboxylovou kyselinu u metabolitu 4. Zajímavé je, že tento hybrid 6-chlortakrinu a troloxu poskytl metabolity, které nebyly oxidované v takrinové části molekuly. Vzhledem k citlivosti troloxu na oxidační činidla se molekula metabolisovala poměrně rychle, a to přednostně v troloxové části za vzniku chinoidní struktury.

3.2.7 METABOLISMUS TRYPTOFANU

Tryptofan je aromatickou esenciální aminokyselinou, která obsahuje indolovou skupinu a jedno chirální centrum a která je v organismu prekurzorem pro syntézu řady dalších biologicky aktivních látek jako je například serotonin, melatonin nebo niacin. Z léčiv, která obsahují fragmenty tryptofanu, lze zmínit například alkaloid vinblastin, nesteroidní protizánětlivé léčivo indometacin a antihypertenzivum pindolol (Palego et al. 2016).

Metabolismus tryptofanu v lidském organismu může být rozdělen na dvě základní větve (Palego et al. 2016). První metabolická dráha vede k produkci signálních molekul indolaminového typu (například serotonin nebo melatonin), při které zůstává zachovaný indolový skelet. Na této přeměně se podílí enzym tryptofanhydroxyláza, která se vyskytuje například v serotoninergních neuronech v mezencefalonu, v krevních buňkách či v neuroendokrinních epiteliálních buňkách v plicích. Druhou dráhou, kterou se metabolisuje v lidském organismu více než 90 % L-tryptofanu, dochází k rozštěpení indolového cyklu a k tvorbě látek odvozených od L-kynureninu (například chinolinová kyselina, nikotinová kyselina, nikotinamidadeninukleotid). Tato dráha probíhá téměř ve všech lidských tkáních a jejím limitujícím biochemickým krokem je oxidační otevření indolového cyklu, které může být katalyzované buď tryptofan-2,3-dioxygenázou (TDO), která je převážně exprimovaná v játrech či mozkových astrocytech nebo indolamin-2,3-dioxygenázou (IDO) přítomnou v buňkách imunitního systému a mikroglíích, a to za vzniku molekuly *N*-formylkynureninu (Colin-Gonzalez et

al. 2012; Heyes et al. 1993, Heyes et al. 1997). *N*-formylkynurenin může být dále metabolisován oxidační nebo deaminační cestou, kdy oxidační kaskáda je spojena se zánětlivými procesy, kdežto deaminační cesta s procesy neuroprotektivními. Můžeme tak usuzovat na dva opačné účinky metabolitů odvozených od L-kynureninu, a to cytoprotektivní (např. kynurenová kyselina) nebo cytotoxický (např. chinolinová kyselina) (Colin-Gonzalez et al. 2012). O kyselině kynurenové je také známo, že má antagonistický účinek na glutamátových excitačních receptorech a to i na glutamátových NMDA receptorech na rozdíl od chinolinové kyseliny, která na stejných receptorech působí jako agonista (Matouš et al. 2010). Dvě základní metabolické dráhy L-tryptofanu jsou znázorněny na Obr. 11.



Obr. 11: Základní metabolické dráhy L-tryptofanu. Převzato z: www.newworldencyclopedia.org

Část L-tryptofanu přijatého v potravě je také metabolisována, a to pomocí gastrointestinální mikroflóry, převážně díky bakteriím *Lactobacillus sp.*, a *Clostridium sporogenes*. L-tryptofan se jejich činností metabolisuje na indol-3-aldehyd a indol-3-propionát tzv. IPA. Vlivem běžných bakterií vzniká samotný indol. Tyto struktury mají různé účinky v organismu, z hlediska této diplomové práce je vhodné zmínit účinky IPA. IPA snižuje poškození DNA a lipidovou peroxidaci v neuronech, vycytává hydroxylové radikály a inhibuje skládání amyloidu β v amyloidní plaky. Z důvodu těchto účinků se může řadit mezi potenciální terapeutika AD (Zhang a Davies 2016).

3.3 SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

Spojení LC-MS je kombinace separační techniky se specifickým detektorem, která je klíčová pro určování molekulové hmotnosti, identifikaci nebo kvantifikaci látek v biologických matricích složených z mnoha komponent. Mezi výhody tohoto systému patří možnost analýzy složitých vzorků spolu s jistotou v identifikaci látek, a to díky informacím o retenčním čase i strukturních parametrech, možnosti odhalení koeluce píků či menší spotřebě vzorku a dalšími (Nováková et al. 2013).

3.3.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je v současnosti nejvíce využívanou metodou separace, a to pro její vysokou selektivitu a citlivost i pro možnost využití v mnoha analýzách velkých sérií vzorků či složitých směsí. Je převážně využívána ve farmaceutickém průmyslu, a to ve všech jeho částech od objevení léčiva až po jeho uvedení na trh. Ve výzkumu léčiv je zpočátku využívána ke stanovení čistoty syntetizované látky, k charakterizaci této NCE a později k hodnocení klinických studií i k výstupní kontrole již registrovaného a vyráběného léčiva farmaceutickými firmami (Ahuja a Rasmussen, 2007).

Princip HPLC

Chromatografické metody včetně kapalinové chromatografie se řadí mezi separační metody, které jsou založeny na rozdělení látek ve směsi mezi dvě různé nemísitelné fáze, a to fází mobilní (MF) neboli pohyblivou a stacionární, nepohyblivou (SF). Principem separace je odlišná míra a typ interakce dělených látek s mobilní a stacionární fází. Míru distribuce složek mezi tyto fáze lze charakterizovat distribuční konstantou K_d , kde C_s je koncentrace složky ve stacionární fázi a C_m v mobilní fázi.

$$K_d = C_s / C_m$$

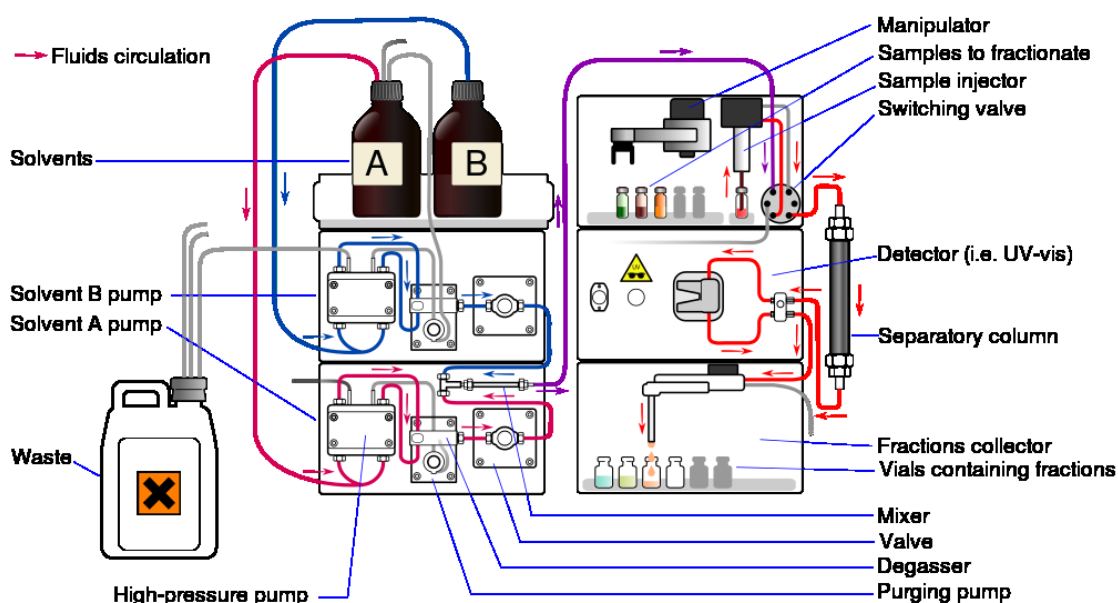
Delší setrvání molekul látky ve stacionární fázi představuje vyšší hodnotu distribuční konstanty, a tím i vyšší retenci dané látky. Retence látky bývá hodnocena pomocí retenčních faktorů.

Na základě rozdílnosti ve fyzikálně chemických vlastnostech zkoumaných látek v jednom vzorku a ovlivnění separace povahou obou fází se volí mezi isokratickou či gradientovou elucí. Isokratická eluce představuje eluci mobilních fází o konstantním

složení, na rozdíl od eluce gradientové, při které je složení MF měněno ve prospěch složky s vyšší eluční silou. Jednotlivé oddělené zóny analytu jsou převáděny do podoby chromatografického záznamu s charakteristickými křivkami (píky) při průchodu detektorem (Nováková et al. 2013).

Instrumentace HPLC

Ačkoli je kapalinová chromatografie využívána pro řadu různých analýz a výzkumů, její základní model není nutno s každým měřením upravovat či měnit. Kapalinový chromatograf se zpravidla skládá z několika základních částí s různými funkcemi (Obr. 12).



Obr. 12: *Komponenty kapalinového chromatografu: zásobníky MF, čerpadla, degaser, autosampler, šesticestný ventil, kolona, detektor a odpadní nádoba. Převzato z: www.wikipedia.org*

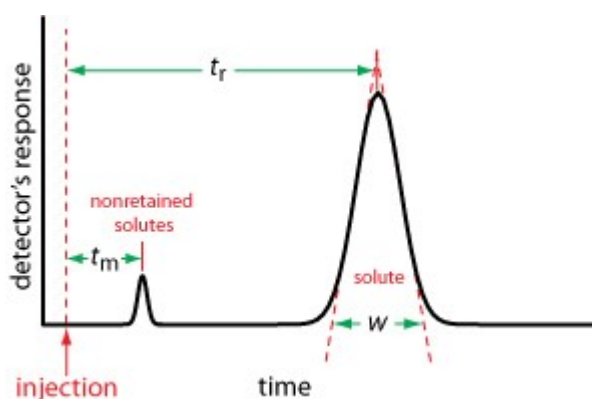
Vzorek ve vialce je umístěn v zásobníku vzorků s přesně označenou polohou. Při nízkém objemu vzorku se do vialek vkládají tzv. inserty, které mají menší objem, a zajistí tak dostatečnou výšku hladiny pro náběh vzorku i u malých objemů. Vzorek je nasáván do systému pomocí jehly autosampleru neboli automatického dávkovače, který zajišťuje přesné dávkování vzorku o předem nastaveném objemu. K uchování mobilních fází slouží zásobníky, umístěné v úrovni nad HPLC systémem. Mobilní fáze je pomocí čerpadla vedena do systému, a to přes speciální filtry pro zachycení tuhých částic. Před smísením MF se vzorkem dojde ještě k jejímu odplynění v odplynovači (degaseru). Následně se pomocí šesticestného ventilu vzorek mísí s mobilní fází. Mobilní fáze s analyzovanými látkami se dostává na předkolonu a následně kolonu,

kde dochází k jejich separaci. Kolona je umístěna v termostatu, který zajišťuje rovnoměrnou distribuci teploty v celém kolonovém prostoru. Zabraňuje tak lokálním teplotním výkyvům, které by jinak negativně ovlivňovaly viskozitu MF, schopnost separace či rychlost separace jednotlivých analytů.

V současné době je na trhu mnoho komerčně dostupných kolon lišících se různými parametry, mezi něž patří druh sorbentu, jeho zrnění nebo kolonové rozměry. Po separaci na koloně dochází k detekci látek detektorem na základě rozdílného signálu samotné MF a MF s analytem. V této diplomové práci byl použit hmotnostní spektrometr, jehož použití v HPLC detekci narůstá (Nováková et al. 2013).

Základní charakteristiky separačního procesu

Mezi základní chromatografické charakteristiky patří měřítka retence a účinnost chromatografické kolony. Základní retenční charakteristikou je retenční čas t_R , popřípadě retenční objem V_R . Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do jeho eluce neboli do dosažení maxima eluční křivky. Tato veličina je kvalitativní charakteristikou látky. Retenční objem je objem, který proteče systémem za retenční čas. Stejnou rychlostí jako mobilní fáze se pohybuje i látka, která není na koloně zadržována. Je označována jako inertní a její retenční čas se nazývá mrtvý retenční čas t_m (Obr. 13). Důležitými kvantitativními charakteristikami jsou plocha pod píkem (A) nebo výška píku (h), která se odečítá z chromatogramu.



Obr. 13: Popis chromatogramu. Převzato z: www.community.asdlib.org

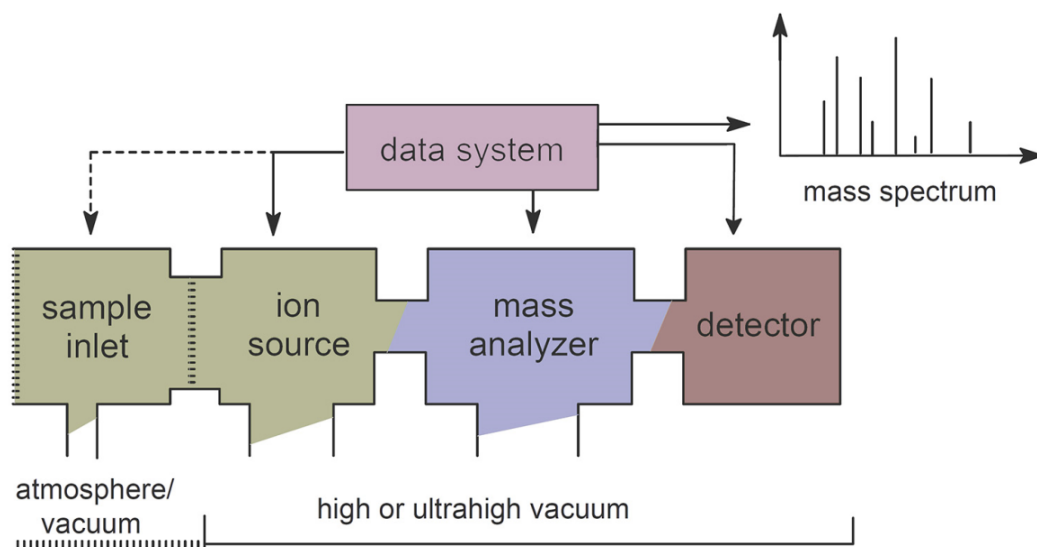
Ukazatelem kvality separace je míra rozšiřování elučních zón dělených látek označovaná jako účinnost chromatografické kolony. Veličinou účinnosti je počet teoretických pater (N), která představuje teoretickou výškovou část kolony, ve které průměrně dochází k jednomu ustálení rovnováhy analytu mezi MF a SF. S vyšším počtem teoretických pater N je kolona účinnější, protože dochází méně k rozšiřování

analytu při průchodu kolonou. Počet teoretických pater je závislý na mnoha parametrech, jako je délka kolony, rychlost průtoku mobilní fáze, velikost částic kolony či viskozitě mobilní fáze. Dalším ukazatelem kvality separace je veličina asymetrie píku. Lze ji vyjádřit buď pomocí faktoru chvostování nebo faktorem symetrie. Ideální symetrie je dosažena v momentě, kdy se hodnota faktoru symetrie rovná 1. Odchytky od této hodnoty k nižším respektive k vyšším hodnotám jsou označovány jako frontování respektive chvostování (Nováková et al. 2013).

3.3.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Princip metody

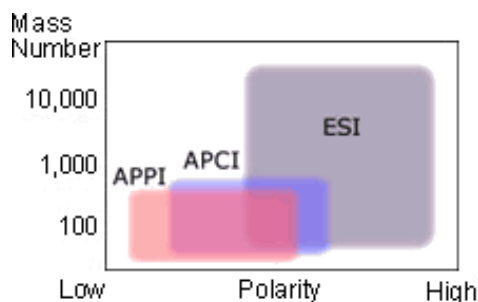
Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, při které dochází různými způsoby k převedení látek na ionty (ionizace), k jejich separaci na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z) a k následné kvalitativní či kvantitativní detekci. Na rozdíl od jiných spektroskopických metod (NMR, Ramanova spektrometrie) se jedná o destruktivní metodu, která ale nalézá uplatnění v celé řadě vědních oborů jako je například organická a bioorganická chemie, analytická chemie a farmaceutická chemie či analýza. Základní schéma hmotnostního spektrometru je znázorněno na Obr. 14. Skládá se z iontového zdroje, do kterého vstupuje analyt a kde dochází k jeho ionizaci, analyzátoru, ve kterém probíhá jeho separace dle m/z a detektoru, kde dochází k samotné detekci iontů (Gross et al. 2011).



Obr. 14: Schéma instrumentace hmotnostního spektrometru. Modifikováno z: www.dgms.eu

Ionizační techniky

Za poslední desetiletí bylo vyvinuto mnoho ionizačních technik za atmosférického tlaku. Při spojení LC-MS se nejvíce využívá metoda ionizace elektrosprejem (ESI) a za ní hned následuje chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a v případě vysoce nepolárních analytů fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Jaká ionizační technika se použije při analýze, vyplývá z vlastností analytu – převážně z jeho polaritity a molekulové hmotnosti viz Obr. 15 (Kromidas 2017).



Obr. 15: Schéma znázorňující preference jednotlivých ionizačních technik u látek s rozdílnou polaritou a molekulovou hmotností. Převzato z: www.shimadzu.eu.com

Ionizace elektrosprejem je technikou, kdy je eluát při vstupu kapilárou do iontového zdroje zmlžen a nabit množstvím nábojů. V dalším kroku dochází k odpařování rozpouštědla MF a tím k zahušťování nábojů na částici analytu. Tímto působením se analyt rozpadá na mnohem menší kapky, až v závěru představuje jedna kapka jeden ion. Tato metoda se používá často k ionizaci velkých molekul (Kromidas 2017). Technika APCI byla poprvé popsána Carollem et al. v roce 1974. Analyt prochází do iontového zdroje přes vyhřívanou komoru - takzvaný „heater“, kde vlivem vysokých teplot dochází k odpaření rozpouštědla. Teprve následně dochází od kovové jehly (corony) k nabití částic mobilní fáze a ve chvíli, kdy rozdíl nábojů mezi mobilní fází a analytem dosáhne určité hodnoty, nabijí se i částice analytu. Z Obr. 16 vyplývá, že APCI je ionizační technika vhodná k ionizaci menších polárních nebo středně polárních molekul.

Analyzátory

Analyzátory mají dvě důležité funkce. Za prvé rozdělují ionty podle poměru m/z a za druhé umožňují jejich urychlení a fokusaci. Analyzátory působí na základě různých fyzikálních principů dle toho, o který konkrétní analyzátor se jedná. Na principu rozdílné stability oscilací iontů v prostředí stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí funguje kvadrupól. Kvadrupól se skládá ze 4 tyčí, na které je

přiváděno napětí. Tyče naproti sobě mají stejné napětí, a to buď kladné stejnosměrné, nebo záporné stejnosměrné. Na všechny tyče je navíc přiváděno ještě vysokofrekvenční střídavé napětí. Jednoduchý kvadrupól je dnes využíván už jen minimálně, v praxi se setkáme spíše se spojením tří kvadrupólů za sebou (Gross et al. 2011). Na obdobném principu jako kvadrupól pracuje i další z analyzátorů iontová past.

Novějším typem analyzátorů je orbitrap, jež pracuje na principu různých frekvencí harmonických oscilací. Na trh byl poprvé uveden v roce 2005, a jak vyplývá již z názvu, jedná se o typ iontové pasti. Zaznamenávány jsou oscilace jednotlivých iontů oscilujících v elektrostatickém poli u centrální elektrody a pomocí Fourierovy transformace je tento záznam převáděn na hodnoty m/z (Scigelova a Makarow 2007). Vzhledem k faktu, že se mezi sebou jednotlivé analyzátory liší a ani jejich možnost využití není stejná, objevuje se stále více trend vytvářet analyzátory hybridní. Hybridní analyzátory jsou vytvářeny spojením dvou analyzátorů za účelem zisku co nejlepších vlastností z každého z nich (Nováková et al. 2013). V této diplomové práci byl použit vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr (high resolution mass spectrometry, HRMS) Q Exactive Plus, který je po konstrukční stránce hybridem kvadrupólového hmotnostního filtru a orbitrapového analyzátoru. Pro tento přístroj je charakteristická vysoká přesnost stanovení m/z , kterou lze s výhodou využít v proteomických a metabolických studiích, na druhou stranu však nedosahuje orbitrap takové citlivosti detekce jako elektronásobič.

Detektory

Nejjednodušším detektorem v hmotnostní spektrometrii je Faradayova klec, v praxi se využívají hlavně elektronové násobiče nebo fotonásobiče (Gross et al. 2011).

Základní typy skenů a chromatografických záznamů

Výsledky lze na LC-MS zaznamenat několika způsoby označovanými jako MS záznamy. Základním skenem je MS sken, při kterém dojde k změření hmotnostního spektra ve zvoleném rozsahu m/z (full sken). Závislost intenzity signálu konkrétního iontu v čase zaznamenává selektivní záznam jednoho nebo více iontů (SIM). Sken, který poskytuje spektrum produktových iontů vzniklých fragmentací z rodičovských iontů, se označuje jako sken produktových iontů. Je možné tak sledovat fragmentační reakci jednoho (single reaction monitoring, SRM) nebo více iontů (multiple reaction monitoring, MRM). Skenem neutrálních ztrát se rozumí záznam prekurzorů, které podlely vybrané neutrální ztrátě (Nováková et al. 2013).

Jinými typy záznamu, které byly použity v této diplomové práci, jsou fragmentace všech iontů neboli all ion fragmentation (AIF) a data dependentní skenování neboli dd-MS². Z praktických důvodů byly během MS analýz použity metody, které střídavě kombinovaly AIF a dd-MS² s full skeny (Full MS). Ve Full MS/AIF záznamu se zobrazuje v prvním cyklu sken všech iontů v dané polaritě a rozsahu m/z (Full MS) a ve druhém cyklu fragmentace všech iontů, který pokrývá stejný rozsah m/z (Kumar et al. 2013) Pro metodu Full MS/AIF je charakteristický velký rozsah m/z , který umožňuje zaznamenat velké množství informací o analyzovaném vzorku. Nevýhodou je, že ionty, které se vedou do kolizní cely k fragmentaci, mohou v případě koeluce při LC-MS/MS uspořádání pocházet z různých chemických látek, a výsledné fragmentační spektrum může být tedy velmi složité. Naproti tomu metoda Full MS/dd-MS² je nastavena tak, aby z full skenu vybrala několik nejintenzivnějších iontů, a ty izolovaně v malém rozsahu m/z podrobila fragmentaci a skenu vzniklých fragmentů. Výhodou Full MS/dd-MS² je, že fragmentační spektra pocházejí prakticky z jednoho prekurzorového iontu a snadněji se interpretují. Full MS/dd-MS² je metodou běžně používanou v proteomice, metabolomice a v *in vitro* metabolických studiích, a z toho důvodu byla použita i v této diplomové práci (Castro - Perez 2007).

Všechny tyto MS záznamy je možné zobrazovat a hodnotit několika způsoby. Jedná se o chromatogram celkového iontového proudu (TIC), kdy software hodnotí všechny intenzity iontů a promítá je v chromatogramu a extrahovaný iontový chromatogram (XIC), který představuje chromatogram určitého charakteristického iontu (Nováková et al. 2013).

Vyhodnocování výsledků

Každou látku lze po změření na HPLC vyhodnocovat kvalitativně nebo kvantitativně. Kvalitativní analýzou se rozumí identifikace látek, pro které je s výhodou používáno určení retenčních časů či objemů z integrace píků v chromatografických softwarech. Vzhledem k tomu, že v této diplomové práci se pracuje s látkou, která nebyla nikdy předtím analyzována, nebylo ji možné identifikovat pomocí jejich retenčních časů respektive objemů. K jejich identifikaci byl použit detektor MS, jehož spektra poskytují detailní informace o molekulové hmotnosti, izotopovém zastoupení a o fragmentech molekuly (MS a MS/MS). Vedle hmotnostního detektoru lze k identifikaci látek využívat také například NMR, pracující na odlišném principu. Kvantitativní hodnocení se naopak zabývá vztahem mezi množstvím eluované

látky a charakteristikami píku, jako je jeho výška či plocha pod píkem. Jedná se o veličiny relativní, je potřeba tedy vztah mezi naměřenou hodnotou a neznámou koncentrací stanovit empiricky. Ke kvantitativnímu hodnocení lze použít jednu ze čtyř základních instrumentálních metod: metodu vnějšího standardu, metodu přídavku standardu, metodu vnitřního standardu nebo metodu vnitřní normalizace. V této diplomové práci byla kvantifikace provedena metodou vnějšího standardu neboli kalibrační přímkou. Jedná se o metodu, při které je analyzována série standardů a na základě závislosti kalibrační funkce je stanovována koncentrace daného analytu ve zkoumaném vzorku. Pro získání statisticky významných hodnot je vhodné použít 5 - 7 bodů kalibrační řady a měření opakovat minimálně třikrát (Nováková et al. 2013b).

4. CÍL PRÁCE

Předmětem této diplomové práce je studium metabolitů dosud nepublikované látky K1277, která představuje slibné potenciální léčivo AD odvozené od struktury takrinu a DL-tryptofanu. Základní metodologie tohoto studia může být rozdělena na biochemickou část, zabývající se problematikou simulace I. fáze biotransformace pomocí HLM, a na analytickou část, jejíž podstatou je kvantitativní LC-MS/MS stanovení stability látky K1277 v prostředí HLM a určení neznámé struktury jejích majoritních metabolitů. Látka K1277, která je racemickou směsí dvou enantiomerů, byla vybrána pro tento výzkum z toho důvodu, že v současné době vykázala značnou *in vitro* inhibiční aktivitu vůči lidské AChE (tj. IC_{50} v řádu jednotek nM), dále pak významné antioxidační účinky, vysokou pravděpodobnost pronikat HEB, poměrně nízkou hepatotoxicitu a rovněž schopnost potlačovat agregaci amyloidu β^1 .

Cíle této diplomové práce je možné definovat několika klíčovými úkoly:

Cíl 1: Zjistit, za jakých podmínek poskytuje látka K1277 s HLM metabolity I. fáze biotransformace.

Cíl 2: Ověřit analytickou metodu s využitím tandemové vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie pro kvalitativní i kvantitativní hodnocení metabolismu látky K1277.

Cíl 3: Identifikovat jednotlivé metabolity I. fáze biotransformace látky K1277 a navrhnout jejich hypotetickou strukturu.

Cíl 4: Kvantifikovat množství metabolisované parentní látky K1277 na jednotlivé metabolity v závislosti na délce trvání metabolického experimentu.

¹ Jedná se zatím o nepublikovaná data, která byla poskytnuta Katedrou vojenské farmacie a toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany. Toto pracoviště provádělo s látkou K1277 celou řadu biologických testů.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 POUŽITÝ MATERIÁL

5.1.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

K experimentu byly použity lidské jaterní mikrosomy o koncentraci 20 mg/ml se sériovým číslem 0910312 zakoupené od firmy XenoTech. Byly připraveny z lidské jaterní tkáně získané od 200 lidských dárců, z toho 100 dárců představovaly ženy a 100 dárců muži. Vzorky byly odebrány od lidí hispánské, asijské i kavkazské rasy a příčinou jejich úmrtí byla nejčastěji cerebrovaskulární onemocnění nebo úraz hlavy. U mikrosomů byla detekována aktivita cytochromu P450 (0,478 nmol/mg proteinu), aktivita cytochromu b5 (0,369 nmol/mg proteinu) a NADPH cytochrom c reduktázová aktivita (162±7 nmol/mg proteinu/min). Jako suspenzní médium byl použit vodný roztok sacharózy. Po doručení byly mikrosomy dle pokynů dodavatele uloženy v kapalném dusíku (-197 °C). Těsně před započítáním experimentů byly mikrosomy rozmrazeny volným zahřátím na laboratorním stole a rozděleny po 25 µl do polypropylenových zkumavek. Nepoužité mikrosomy v prvním experimentu byly zamrazeny a dále uchovávány při teplotě -80 °C v hlubokomrazícím boxu. V dalších experimentech byla rozmrazována příslušná množství zamražených mikrosomů této výrobní série.

K aktivaci mikrosomů byl použit roztok Rapid Start NADPH regenerační systém obsahující v jedné vialce 0,5 ml 100 mM NADP, 0,5 ml 500 mM glukózy-6-fosfátu, 0,5 ml 100 jednotek/ml glukóza-6-fosfát-dehydrogenázy v 20 mM draselno-fosfátovém pufru o pH 7,4. Byl zakoupen od firmy XenoTech. 1,5 ml tohoto aktivačního roztoku bylo dle instrukcí výrobce smícháno s 3,5 ml ultračisté vody, 30 s vortexováno, rozděleno na alikvoty o 50 µl a uloženo v hlubokomrazícím boxu při -80 °C. Před prováděním experimentů byly alikvoty aktivačního roztoku volně rozmrazeny na laboratorním stole.

5.1.2 CHEMIKÁLIE

Při přípravě vzorku pro metabolickou studii byla použita ultračistá voda stupně kvality ASTM typ I (18.2 MΩ.cm při 25 °C), připravená přístrojem Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF (ThermoFisher Scientifici Bremen, Německo) a fosfátový pufr. Fosfátový pufr o pH = 7,4 a c = 100 mM byl připraven z KH₂PO₄ (Sigma Aldrich

HPLC čistota) a ultračisté vody. pH fosfátového pufru bylo upraveno pomocí vodného roztoku KOH (Sigma Aldrich, HPLC čistota) o $c = 5 \text{ M}$. K ukončení metabolické reakce vzorku v prostředí mikrosomů byl přidán potřebný objem acetonitrilu (ACN) (Sigma Aldrich, LCMS čistota) ochlazeného na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Při přípravě mobilních fází byl použit takéž ACN (LCMS čistoty) a opět ultračistá voda stupně kvality ASTM typ I. Do obou typů mobilní fáze byla přidána kyselina mravenčí (FA) (Sigma Aldrich, LCMS čistota).

Zkoumanými látkami byly také 6-chlortakrin a LD-tryptofan. 6-chlortakrin byl dodán Katedrou vojenské farmacie a toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany a byla stanovena jeho nekalibrovaná čistota více než 95 % nezávislou studií pomocí HPLC a NMR. Racemát aminokyseliny tryptofanu byl zakoupen od firmy Sigma Aldrich a jeho čistota byla stanovena výrobcem na více než 99 %.

5.1.3 ZÁSObNÍ ROZTOKY

Pro potřeby studia metabolismu byly připraveny zásobní vodné roztoky látky K1277 o třech rozdílných koncentracích: $2,5 \text{ } \mu\text{M}$, $10 \text{ } \mu\text{M}$ a $50 \text{ } \mu\text{M}$. Tyto roztoky byly připraveny rozpuštěním navážky pevné látky K1277, určené analytickými vahami s přesností na $\pm 0,01 \text{ mg}$, v ultračisté vodě za podpory třepáním a ultrazvukem. V tomto koncentračním rozmezí byla látka K1277 ve vodě za laboratorní teploty dokonale rozpustná. Nekalibrovaná čistota látky K1277 vyšší než 95 % byla stanovena v rámci jiných studií pomocí HPLC a NMR pracovištěm, které tuto látku ke studii poskytlo.

5.2 TECHNICKÉ VYBAVENÍ

5.2.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

V průběhu experimentu byly využity následující přístroje:

- Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 složený z binárního vysokotlakého čerpadla HPG – 3400RS, vakuového odplynovače, kolonového termostatu TCC - 3000, autosampleru WTS – 3000 s nástřikovou smyčkou o objemu 25 µl a UV/VIS detektoru VWD - 3000 (ThermoFisher Scientific, Německo)
- Hmotnostní spektrofotometr Q Exactive Plus (ThermoFisher Scientific, Německo)
- Analytické váhy Sartorius CPA225D - 0CE (Sartorius AG, Německo)
- Přístroj pro ultračistou vodu Barnstead Smart2Pure 3 UV/UF (ThermoFisher Scientific, Bremen, Německo)
- Třepačka Labdancer IKA (Merci, s.r.o, Brno)
- Přístroj pH metr Edge Hanna instrument (Hanna instrument Romania)
- Ultrazvuková lázeň Elma S 40 (UNIPRO - ALPHA C. S., spol s r.o., Praha)
- Přístroj Eppendorf ThermoTop Thermomixer C (Eppendorf North America)
- Ultracentrifuga Universal 320R (Schoeller Instruments s.r.o., Praha)

5.2.2 POMŮCKY

- Kolona Kinetex C18, 150x3 mm, 2,6 µm, 100 Å. 00F-4462-Y0
- Pipety Eppendorf® Reference (0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl)
- In-line filtr s fritou o porozitě 0,5 µm (Vici Jour)
- Skleněné konické inserty (Fischer Scientific)
- Laboratorní sklo, špičky Eppendorf®, lednice a hlubokomrazící box

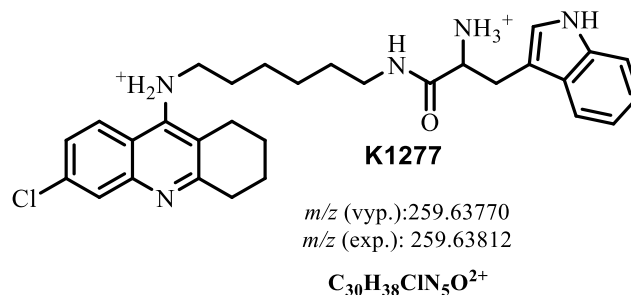
5.2.3 VÝPOČETNÍ PROGRAMY

Pro vyhodnocení a k následné identifikaci metabolitů parentní látky K1277 byly použity programy Chromeleon 6.80 a Xcalibur 3.0.63. K predikci fragmentů jednotlivých metabolitů byl využit program Mass Frontier 7.0. K tvorbě všech grafů a k provedení statistických výpočtů byl použit Microsoft Excel.

Všechny chemické struktury obsažené v této práci byly vytvořeny za pomoci programu ChemBioDraw Ultra 13.

5.3 ZKOUMANÁ LÁTKA K1277

Látka K1277, systematickým názvem *N*-(2-((6-chlor-1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-yl)amino)hexyl-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propylamid dihydrochlorid, je dosud nepublikované potenciální hybridní léčivo vzniklé kombinací 6-chlortakrinu a aminokyseliny tryptofanu, dodané Katedrou vojenské farmacie a toxikologie, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany s nekalibrovanou čistotou vyšší než 95 %. Tato látka má mírně bazickou povahu a dle predikce v programu MarvinSketch 15.12.7.0. vytváří při pH = 7,4 dvakrát nabitý ion jakožto majoritní strukturu. Pro experimenty v této práci byla použita její sůl ve formě dihydrochloridu. V této formě je látka poměrně dobře rozpustná ve vodě a bez obtíží lze připravit její vodný roztok o koncentraci 5 mg/ml. Chemicky se látka skládá z lipofilního akridinového jádra a indolového skeletu, které jsou propojeny alkylovým řetězcem s šesti atomy uhlíku. Struktura látky K1277 včetně sumárního vzorce je možné vidět na Obr. 16. V místě vazby jednoho bazického dusíkatého centra je přítomen chirální uhlík, což vede k existenci dvou enantiomerů látky K1277. Softwarem vygenerovaná hodnota clog P = 5,42 naznačuje, že látka K1277 je zřejmě schopna přestupu přes lipofilní membrány včetně přestupu hematoencefalickou bariérou, který byl v rámci jiných *in vitro* studií u této látky potvrzen a který je zásadní u léčiv ovlivňující CNS. Protože látka byla mnohokrát v rámci řešení diplomové práce analyzována pomocí HRMS, je na Obr. 16 uvedena též experimentálně stanovená přesná hmotnost (tj. údaj označený zkratkou „exp.“)



Obr. 16: Vzorec látky K1277

5.4 MIKROSOMÁLNÍ METABOLICKÁ STUDIE LÁTKY K1277

5.4.1 METODICKÝ POSTUP EXPERIMENTŮ

Metabolická studie látky K1277 s lidskými jaterními mikrosomy byla provedena na základě postupu metabolické studie jiného hybridu takrinu (takrin – trolox) dle Nepovimové et al. 2015 ve třech rozdílných inkubačních časech: 1 hodina, 6 hodin, 24 hodin. Experiment byl proveden ve třech různých vialkách přidáním 50 μl RapidStartu k 25 μl HLM do každé z nich. Směsi byly inkubovány v klidu 5 minut při laboratorní teplotě (tj. cca 23 $^{\circ}\text{C}$). Následně bylo přidáno 420 μl ultračisté vody do každé vialky a směsi byly vortexovány po dobu 1 minuty při otáčkách 1000 RPM. Nakonec bylo přidáno 5 μl vodného roztoku zkoumané látky ze zásobních roztoků do každé vialky o takové koncentraci, aby ve výsledném objemu 500 μl bylo dosaženo těchto koncentrací: 2,5 μM ; 10 μM a 50 μM . Vzniklé směsi byly po danou dobu inkubovány v temperované třepačce při 37 $^{\circ}\text{C}$ a otáčkách 1000 RPM. Přesně po stanovené době inkubace (1 hod.; 6 hod.; 24 hod.) byla reakce v každé z vialek ukončena přidáním 500 μl vychlazeného ACN (-20 $^{\circ}\text{C}$). Vzniklá mikrosuspence byla ve vialkách separována pomocí centrifugy (21000 g, 10 $^{\circ}\text{C}$) po dobu 20 minut a následně bylo odebráno 200 μl supernatantu z každé vialky do tří různých skleněných insertů a podrobena LC-MS/MS analýzám. Tento postup byl proveden nejen pro látku K1277, ale také pro látky, z kterých byla syntetizována, a to pro 6-chlortakrin (6-CHTA) a LD-Tryptofan (TRP). Ke každému experimentu a ke každé studované látce, byl navíc vytvořen slepý vzorek a kalibrační řada sedmi koncentrací dané látky. Slepý vzorek byl vytvořen stejným pracovním postupem jako analyzovaný vzorek, kde místo 5 μl studované látky (K1277; TRP; 6-CHTA) bylo přidáno 5 μl rozpouštědla (H_2O nebo pufr). Hodnoty kalibračních hladin byly nastaveny na koncentrace 0,5 μM ; 1 μM ; 5 μM ; 10 μM ; 25 μM ; 50 μM ; 100 μM . Nejdříve byl připraven zásobní roztok studované látky o koncentraci 0,2965 mg/ml. V dalším kroku bylo do sedmi vialek napipetováno rozpouštědlo (H_2O nebo pufr), a to v objemech 999 μl ; 998 μl ; 990 μl ; 980 μl ; 950 μl ; 900 μl ; 800 μl . Následně byl na hladinu rozpouštědla přidán zásobní roztok studované látky v objemu 1 μl ; 2 μl ; 10 μl ; 20 μl ; 50 μl ; 100 μl ; 200 μl , aby bylo dosaženo požadovaných koncentrací.

Vzhledem k faktu, že po provedení studie s látkou K1277 jakožto hybridem látek takrinu a tryptofanu shodným postupem jako v případě studie hybridu takrin-trolox dle Nepovimové et al. 2015 nebyly po jedné hodně inkubace s HLM zaznamenány

dostatečně vysoké koncentrace metabolitů první fáze biotransformace látky K1277, pro další hodnocení byl experiment proveden ještě několikrát s různými délkami inkubací studovaných látek s HLM, s různými rozpouštědly a v různých pracovních režimech vysokorozlišovacího hmotnostního spektrometru. Přehled tří hlavních experimentů pro tuto diplomovou práci a jejich rozdílů je shrnut v Tab. 1.

Experimenty	1. experiment	2. experiment	3. experiment
Médium pro celý mikrosomální experiment	Voda	Voda	Voda a fosfátový pufr (pH = 7,4; c = 100 mM)
Doba inkubace	1 hodina	6 hodin	24 hodin
Zkoumané látky	K1277	K1277	K1277, 6-CHTA, TRP ²
Typ záznamu	Full MS/AIF	Full MS/AIF	Full MS/AIF a Full MS/dd-MS ²

Tab. 1: Přehled metabolických experimentů, použitých médií, inkubačních dob, analyzovaných látek a pracovních režimů vysokorozlišovacího hmotnostního spektrometru.

5.4.2 MĚŘENÍ NA LC-MS

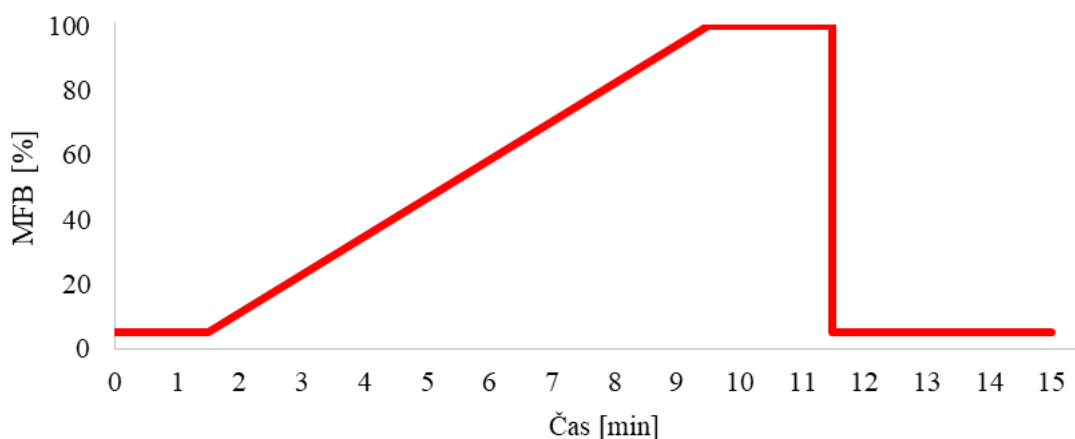
Před každou analýzou jsme nejprve připravili mobilní fáze smísením vody s 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí (FA) (MF A) a acetonitrilu s 0,1 % (v/v) FA (MF B). Protože byl během analýz používán vysokorozlišovací hmotnostní spektrometr, bylo nutné používat rozpouštědla co nejvyšší čistoty. Mobilní fáze byly před zavedením do analytického systému sonifikovány ultrazvukové lázní po dobu minimálně 20 minut za účelem odplynění. Následovala příprava a instalace chromatografické kolony do systému pomocí spojovacích kapilár. Před spuštěním analýzy bylo nutné připravit sekvenční tabulku a nastavit v ní podmínky HPLC metody. Zvolené parametry metody jsou zobrazeny v Tab. 2.

² Vzhledem k velkému objemu získaných dat v metabolické studii látky K1277, nejsou už výsledky metabolických studií látek tryptofanu a 6-chlortakrinu dále rozváděny v této diplomové práci.

Parametr metody	Hodnota
Délka metody	15 minut
Průtok MF	0,35 ml/min
Typ eluce	Gradientová eluce
Složení mobilních fází	MFA=H ₂ O + 0,1%FA MFB=ACN + 0,1%FA
Teplota kolonového termostatu	27 °C
Teplota autosampleru	10 °C
Objem nástřiku	5 µl
Kolona	Kinetex C18, 150x3mm;2.6µm;100 Å
Detektor	UV-VIS a Q Exactive Plus

Tab. 2: Parametry nastavení HPLC metody

Pro všechny LC-MS/MS analýzy byla zvolena 15minutová analytická metoda s využitím gradientové eluce: 0 - 1,5 min 5% MFB, 1,5 - 9,5 min 1 - 100% MFB lineárně, 9,5 - 11,5 min 100% MFB, 11,5 min 5% MFB skokem, 11,5 – 15,0 min 5 % MFB. Všechny vzorky v této studii byly analyzovány 3x a v rámci kvantifikace byly počítány pro výsledné koncentrace aritmetické průměry. Gradientový profil je znázorněn na Obr. 17. Tato metoda byla ověřena v jiných studiích biotransformace a pro tuto diplomovou práci již nebyla nijak měněna ani optimalizována (Nepovimová et al. 2015)



Obr. 17. Eluční gradientový program, který byl použit během LC-MS/MS analýz

Nastavení hmotnostního spektrometru pro identifikaci metabolitů látky K1277 bylo provedeno následujícím způsobem zobrazeným v Tab. 3.

Parametr metody	Hodnota
Průtok stínícího plynu (sheath gas)	50
Průtok pomocného plynu (auxiliary gas)	13
Průtok rozptylového plynu (sweep gas)	3
Napětí sprejovací kapiláry v MS+ módu	3,5 kV
Teplota sprejovací kapiláry	300 °C
Teplota pomocného plynu	300 °C
Nastavení S-lens	50
Počet mikroscanů	1
Maximální nástřikový čas	200 ms
Kontrola automatického zisku (AGC)	3e6
Normalizovaná kolizní energie NCE	35
Rozlišení ve Full MS	70000

Tab. 3: Parametry nastavení MS

5.4.3 VYHODNOCOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Parentní látka a její metabolity byly po inkubaci analyzovány na přístroji LC-MS/MS. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí programů Chromeleon a X - calibur. Z dat získaných pomocí těchto programů byly vytvořeny chromatogramy, fragmentační spektra, kalibrační křivky i grafy izotopových obálek.

Kvalitativní vyhodnocování výsledků

Určení chemické struktury neznámých metabolitů a fragmentů vzniklých během MS/MS analýz patří mezi nejnáročnější úkoly této práce. Všechny navržené struktury jsou tedy jen hypotetickými možnostmi, které bude dále nutné prokázat separací jednotlivých látek a jejich analýzou např. pomocí NMR nebo rentgenostrukturní analýzou. Základním východiskem pro návrh chemických struktur byla podrobná

analýza a interpretace fragmentačního spektra parentní látky K1277, jejíž struktura byla potvrzena pomocí NMR. S pomocí programu Mass Frontier bylo postupně identifikováno přes 10 fragmentů látky K1277, kde k potvrzení chemické struktury sloužila především shoda teoretického a experimentálního m/z v rozsahu $\pm 0,001$, dále dobrá, vizuálně stanovená, shoda mezi teoretickou a experimentální izotopovou obálkou daného iontu. Významnou pomocí při identifikaci fragmentů známé chemické struktury byly především algoritmy štěpení chemických vazeb a jejich reorganizace implementované v programu Mass Frontier.

Na základě znalosti struktur fragmentů parentní látky i fragmentů produktových iontů parentní látky po metabolismu byly dále odhadovány hypotetické struktury metabolitů. V programu X-calibur byly predikovány sumární vzorce jednotlivých iontů na základě předpokladu, které chemické prvky by mohly dané ionty vytvářet (například H, C, N, O, Cl). Přítomnost dalších prvků ve zkoumaných iontech během LC-MS/MS analýzy metabolických produktů látky K1277 se nedala očekávat. Pomůckou pro odhadnutí přítomnosti atomu chloru v iontu byla též jeho charakteristická izotopová obálka (Suelter et al. 1990). Pro posouzení struktury či metabolické změny byly dále vypočítány rozdíly v hodnotách m/z pro parentní látku a nalezené ionty metabolitů ve Full MS. Například zvýšení m/z o 8,000 v molekule s dvojnásobným kladným nábojem znamená s vysokou pravděpodobností připojení atomu kyslíku. Podobných jednoduchých empirických pravidel lze vytvořit a aplikovat celou řadu (Holčapek et al. 2008). Přesnou polohu strukturní obměny, o které se lišila hodnota m/z metabolitu a parentní látky, jsme predikovali na základě struktur jednotlivých fragmentů z fragmentačních spekter metabolitů a na základě predikce sumárních vzorců pomocí programů.

Struktury metabolitů jsme opět potvrzovali shodou izotopové obálky, shodou hodnoty m/z i sumárního vzorce experimentálně naměřeného metabolitu a predikované struktury. Protože LC-MS pracuje s vysokou přesností, pokládali jsme za shodné všechny struktury lišící se maximálně o jednu tisícinu m/z . Po zjištění pravděpodobné struktury metabolitu, byly fragmenty metabolitu porovnány také s predikcí fragmentu daného metabolitu programem Mass Frontier.

Kvantitativní vyhodnocování výsledků

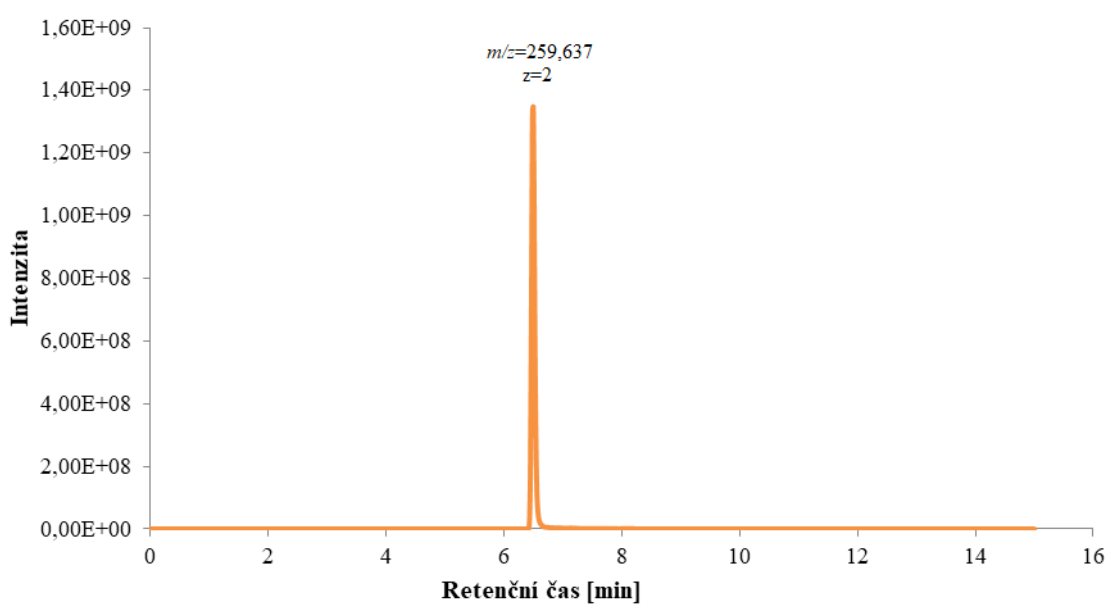
Cílem kvantitativní analýzy bylo především určit, jaké množství látky K1277 se během metabolických experimentů rozložilo. Ke kvantitativnímu vyhodnocování dat z LC-MS/MS jsme použili metodu vnějšího standardu, která byla založena na analýze 7 úroňové kalibrační série roztoků látky K1277 v rozsahu koncentrací od 0,5 μM do 100 μM . Každá kalibrační hladina byla analyzována třikrát. U všech experimentů byla proměřena kalibrační závislost koncentrace zkoumané látky na ploše pod píkem v XIC. Z rovnice přímky $x = a + bc$, kde **a** představuje koncentraci vzorku, **b** směrnici kalibrační přímky a **c** hodnotu plochy pod píkem, bylo vypočítáno množství metabolisované látky. Linearita kalibrace byla hodnocena koeficientem determinace. Zpracování dat a kvantifikace bylo provedeno automaticky v programu X-calibur.

6. VÝSLEDKY

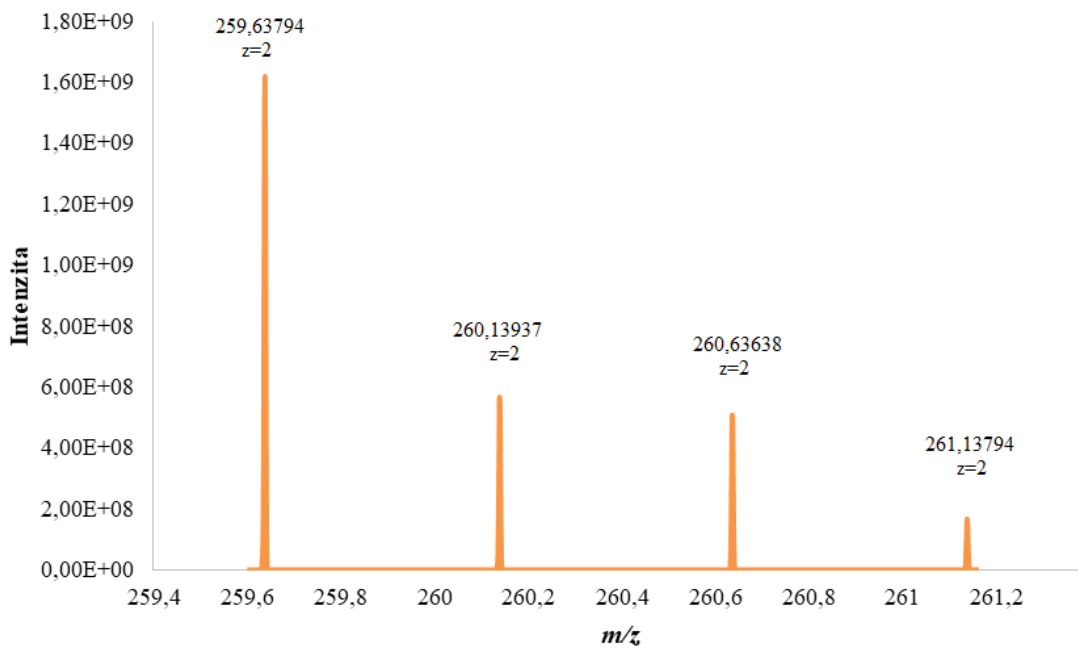
6.1 KVALITATIVNÍ ANALÝZA

6.1.1 PARENTNÍ LÁTKA K1277

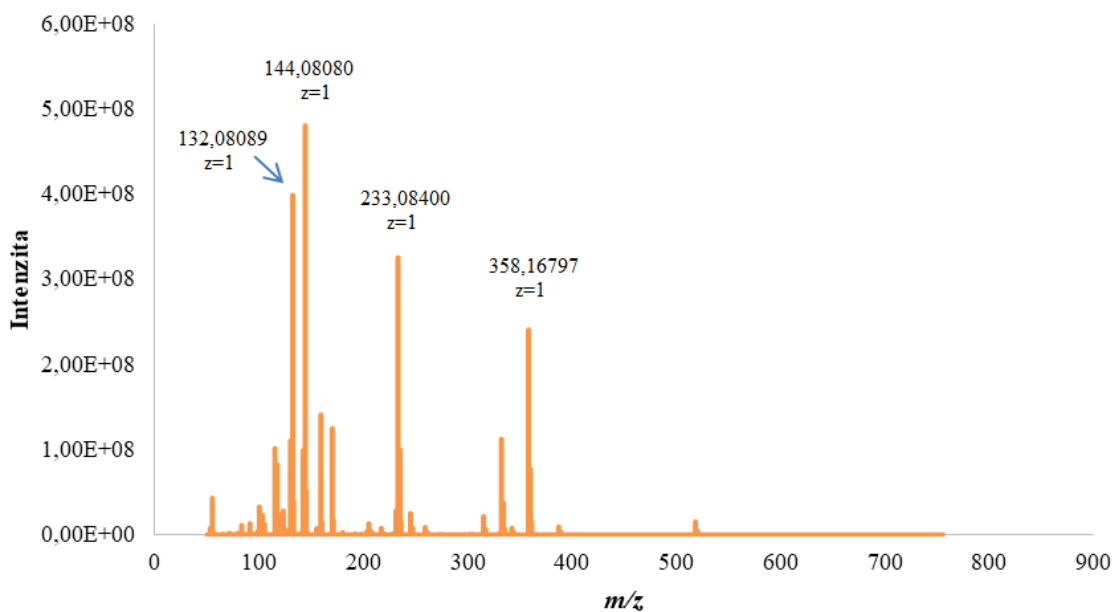
Nejprve byla provedena LC-MS/MS analýza samotné parentní struktury K1277, a to metodami Full MS/AIF a Full MS/ddMS². Každou zkoumanou látku, a tedy i látku K1277 lze na LC-MS/MS charakterizovat pomocí chromatogramu (Obr. 18), izotopové obálky (Obr. 19) a fragmentačního spektra (Obr. 20).



Obr. 18: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) parentní látky K1277 odpovídající rozmezí $m/z=259,637 - 259,638$. K1277 eluuje v retenčním čase 6,51 minut.

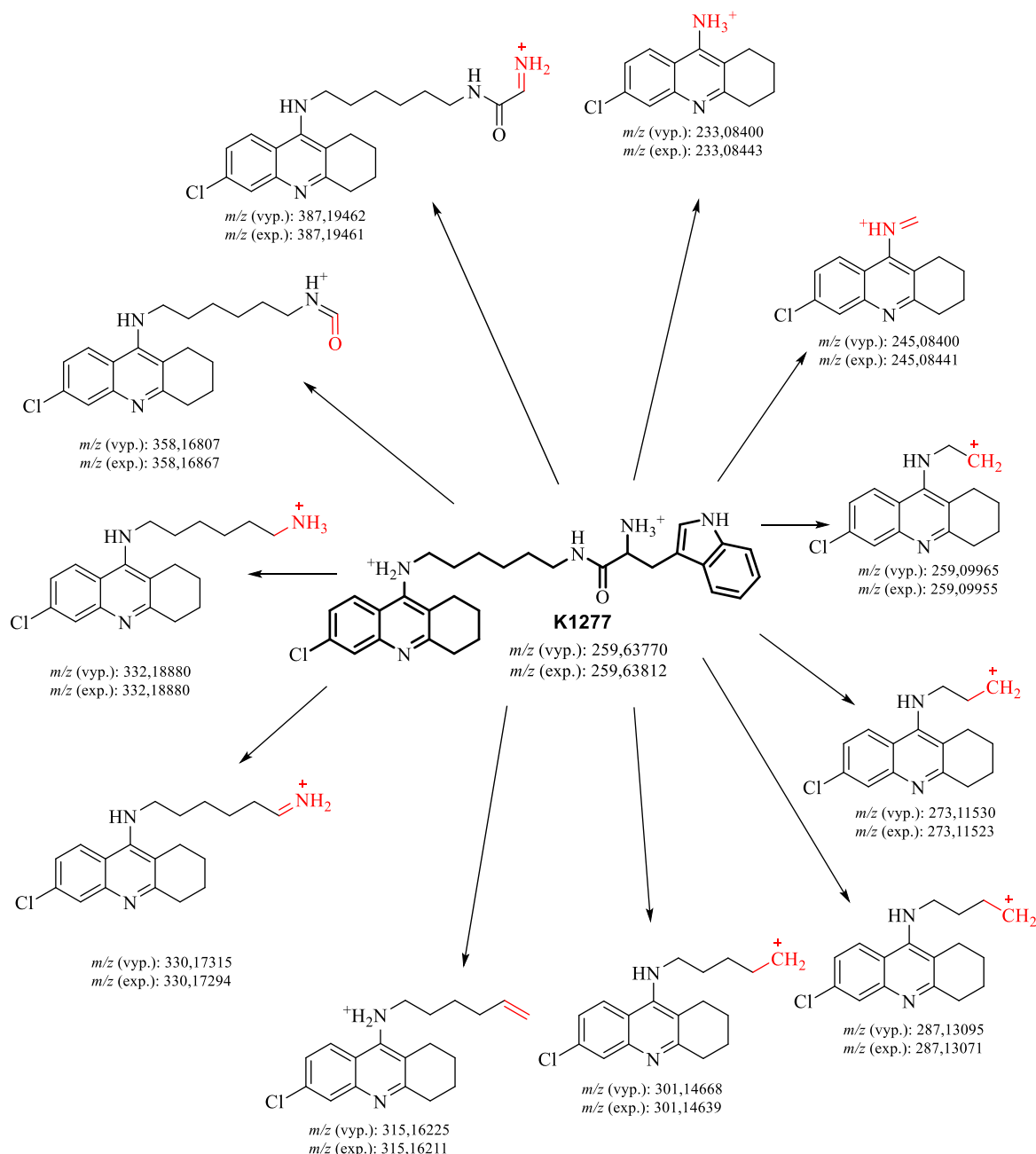


Obr. 19: Charakteristická izotopová obálka parentní látky K1277 ($[M+2H]^{2+}$) stanovená experimentálně.

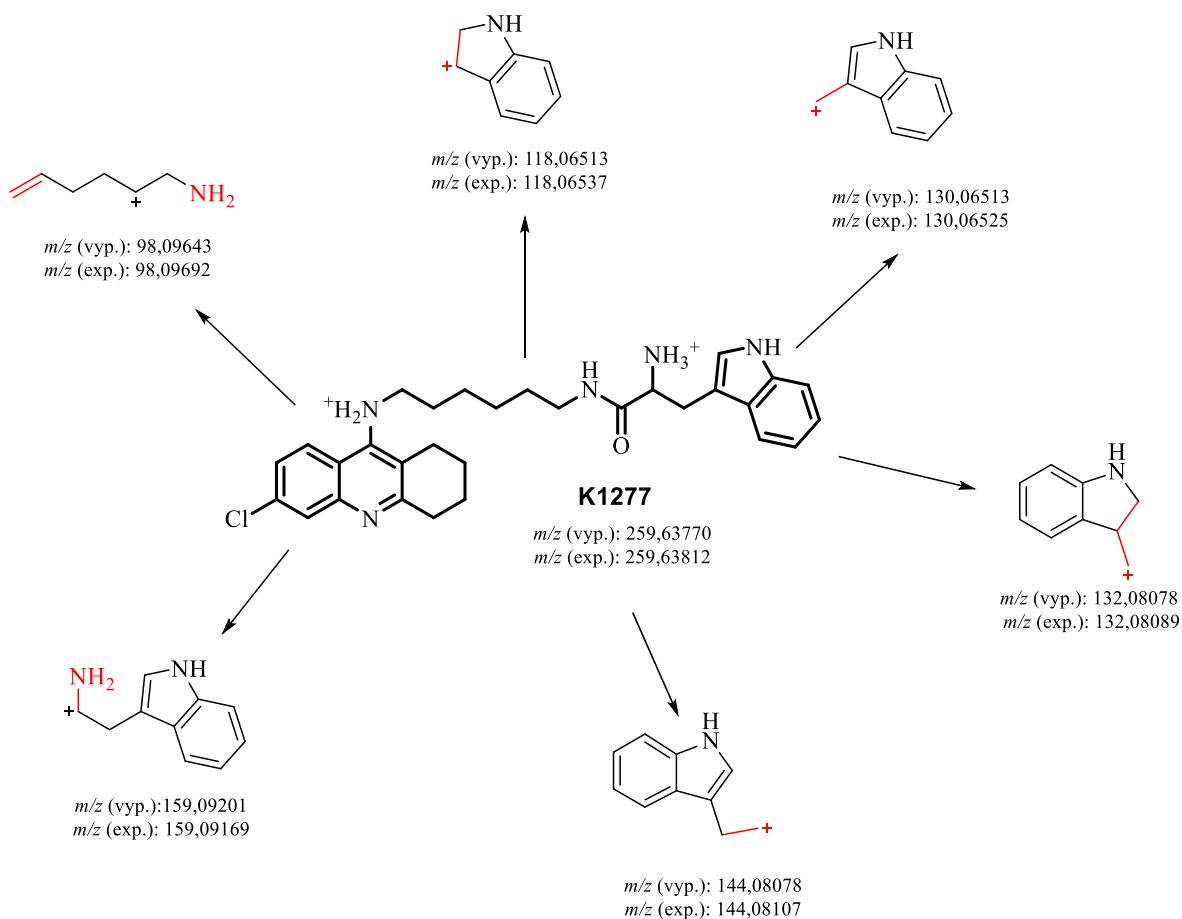


Obr. 20: Fragmentační spektrum parentní látky K1277 s vyznačenými nejintenzivnějšími fragmenty (NCE= 35).

V dalším kroku jsme se zaměřili na rozbor fragmentů parentní struktury, které jsme určovali na základě fragmentačního spektra z Full MS/AIF, predikce sumárního vzorce fragmentů v programu X-calibur a pomocí programu Mass frontier. Hypotetické fragmenty parentní látky lze vidět na Obr. 21. a 22, kde jsou červenou barvou naznačena pravděpodobná místa štěpení původních vazeb. Data z Full MS/ddMS2 poskytla v tomto případě naprosto stejné informace jako Full MS/AIF.



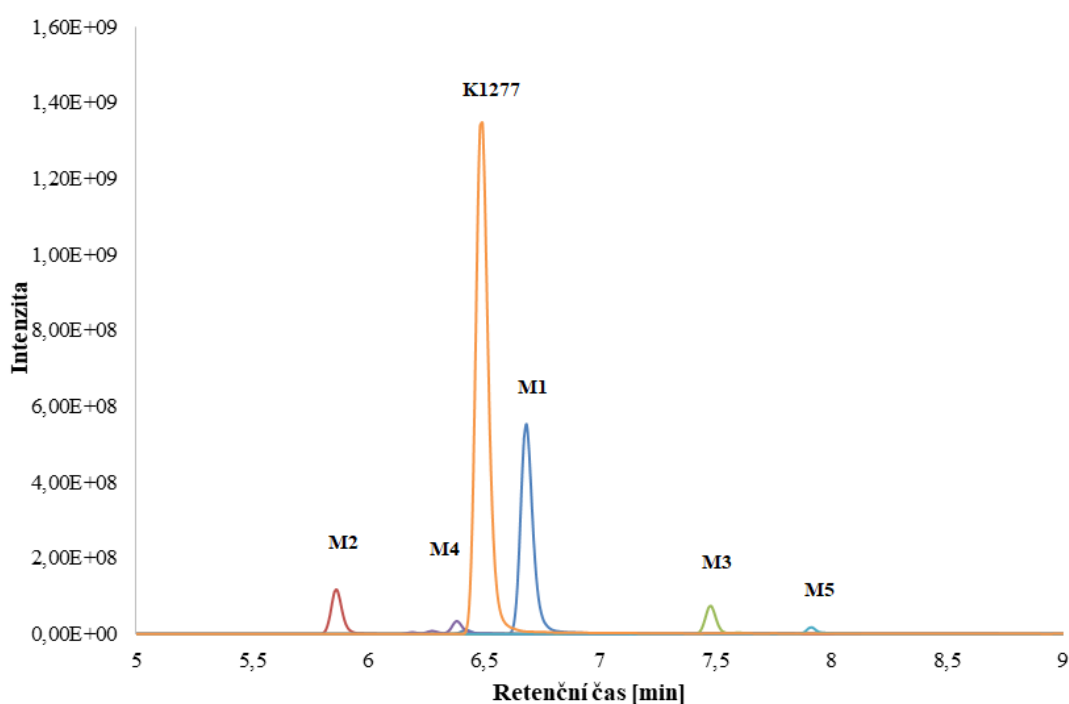
Obr. 21: Mapa struktur 11 hypotetických fragmentů parentní látky K1277 odvozených od části molekuly s 6-chlortetracyklinem. Pod jednotlivými vzorci je porovnána vypočítaná (vyp.) a experimentálně stanovená (exp.) hodnota m/z .



Obr. 22: Přehled hypotetických struktur fragmentů látky K1277 odvozených od části molekuly s tryptofanem a vypočítané a experimentálně stanovené hodnoty m/z .

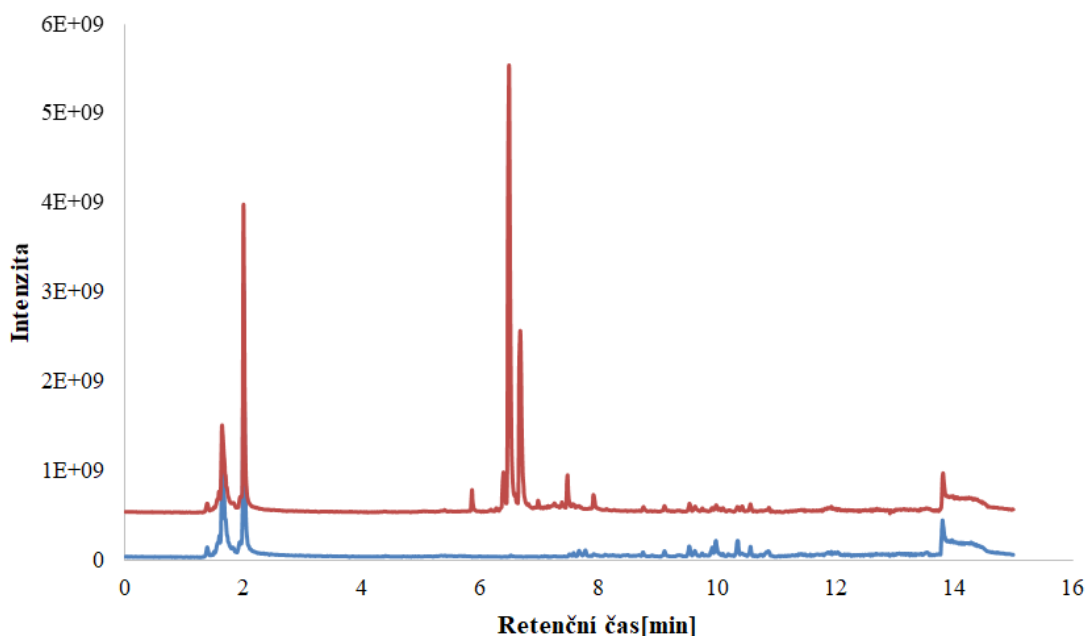
6.1.2 METABOLITY LÁTKY K1277

Metabolity látky K1277 byly zkoumány v několika různých experimentech, z nichž hlavní tři experimenty uvedené v této diplomové práci budou dále okomentovány v diskuzi. V přehledu výsledků se zaměřím pouze na výsledky stanovené metodou s 24hodinovou inkubací látky K1277 s HLM, a to z toho důvodu, že se metoda 24hodinové inkubace jeví z hlediska poskytnutých výsledků jako nejvhodnější k provedení metabolické studie látky K1277, a to ze všech provedených experimentů. Při této metodě bylo na hmotnostním spektrometru zaznamenáno několik metabolitů (Obr. 23) s klesající plochou pod píkem v tomto pořadí: M1 (100 %), M2 (18,29 %), M3 (11,94 %), M4 (10,43 %), M5 (3,37 %). Dva metabolity eluují s nižším retenčním časem ve srovnání s parentní látkou a to v čase 5,85 min. (M2) a v čase 6,41 min. (M4). Naopak s vyšším retenčním časem oproti parentní látce eluují metabolity M1; M3 a M5: 6,70; 7,49 a 7,91 min.



Obr. 23: Přeložené extrahované iontové chromatogramy (XIC) parentní látky a jejích metabolitů. M1, M2, M3, M4, M5 po 24hodinové inkubaci v prostředí HLM.

Přítomnost těchto metabolitů dokazuje porovnání TIC chromatogramu látky K1277 po 24hodinové inkubaci s HLM blankového vzorku, v kterých nebyla látka K1277 přítomna (Obr. 24).

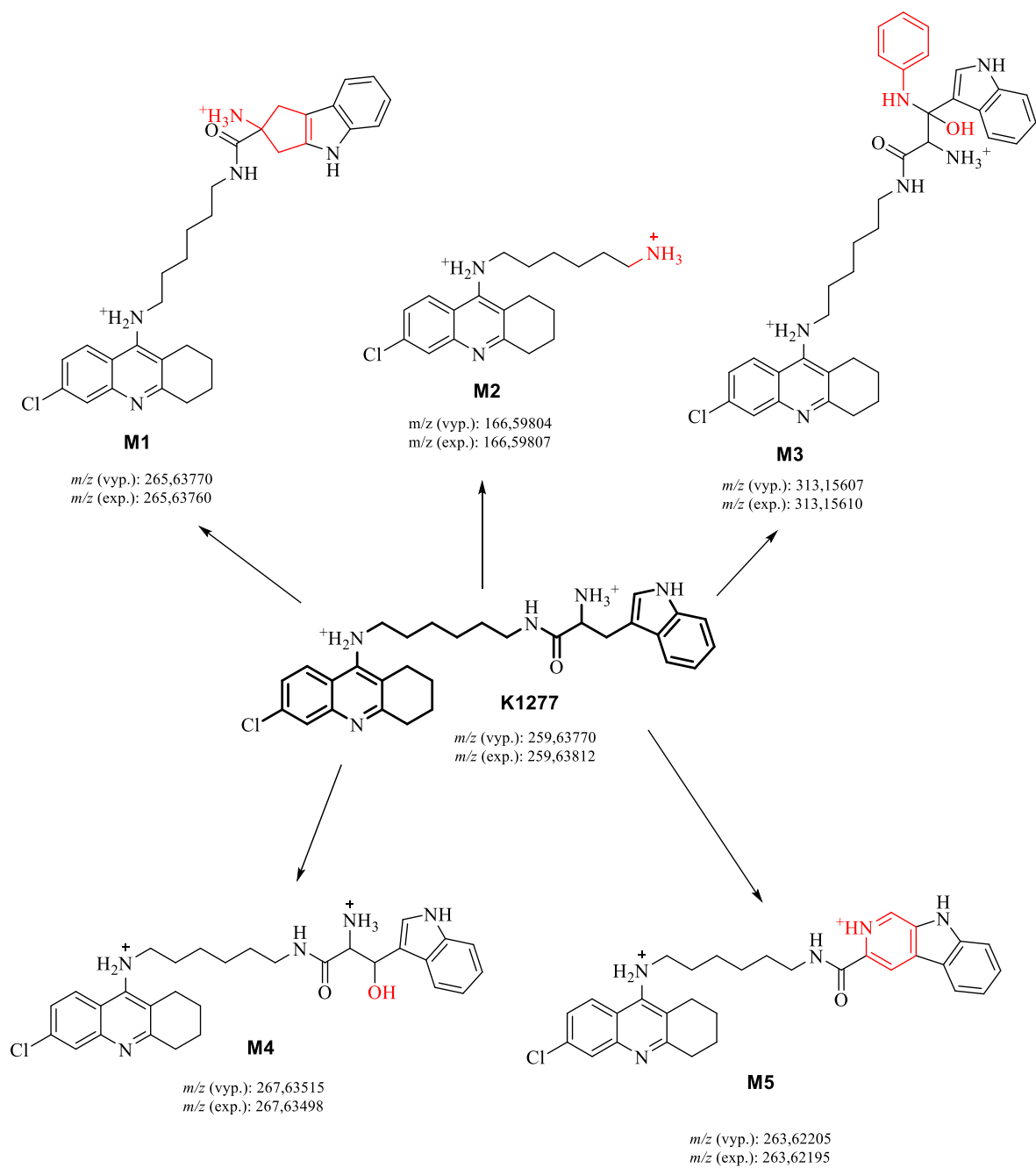


Obr. 24: Přeložené TIC chromatogramy metabolisovaného vzorku K1277 (červeně značené) a vzorku obsahující pouze medium a samotné HLM (značené modře)

Přehled struktur hypotetických metabolitů určených postupem zmíněným v kapitole Vyhodnocování výsledků (5.4.3), vypočítaných hodnot cLog P a cLog D při pH 7,4 (MarvinSketch 15.12.7.0), experimentálně stanovených hodnot m/z a nábojů je uveden v Tab. 4 a na Obr. 25.

Označení metabolitů	cLog P	cLog D	Retenční čas [min]	m/z	Náboj	Rozdíl mezi m/z parentní látky a metabolitu
M1	5,23	0,39	6,70	265,63770	+2	12,000
M2	4,20	0,64	5,85	166,59804	+2	186,078
M3	6,28	1,45	7,49	313,15607	+2	107,038
M4	4,50	0,33	6,41	267,63507	+2	16,000
M5	6,16	4,34	7,91	263,62195	+2	8,000
K1277	5,42	3,98	6,51	259,63794	+2	0

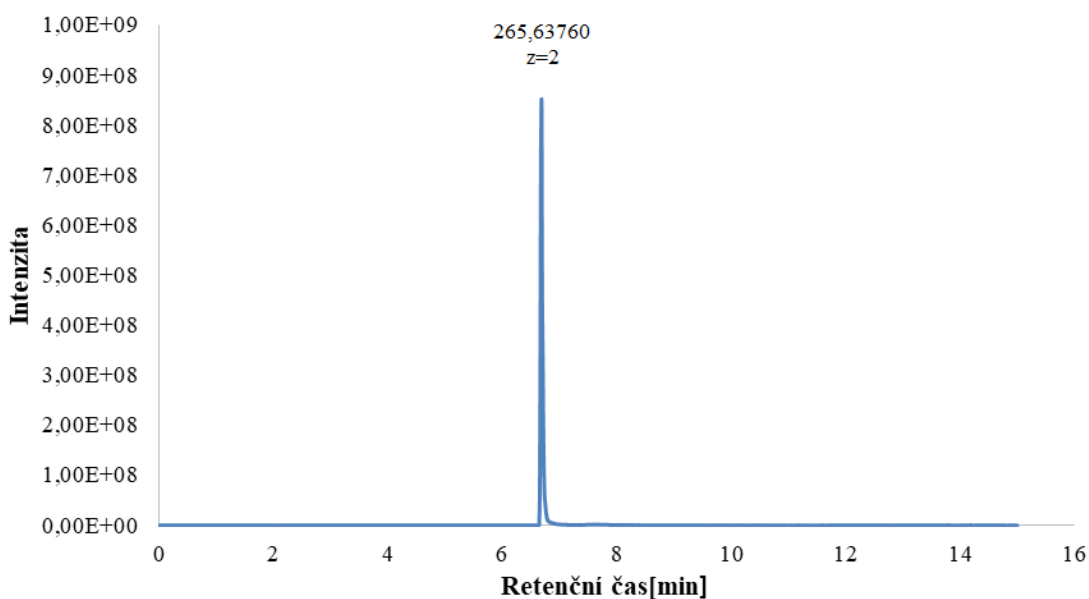
Tab. 4: Přehled metabolitů s uvedením jejich chromatografických charakteristik.



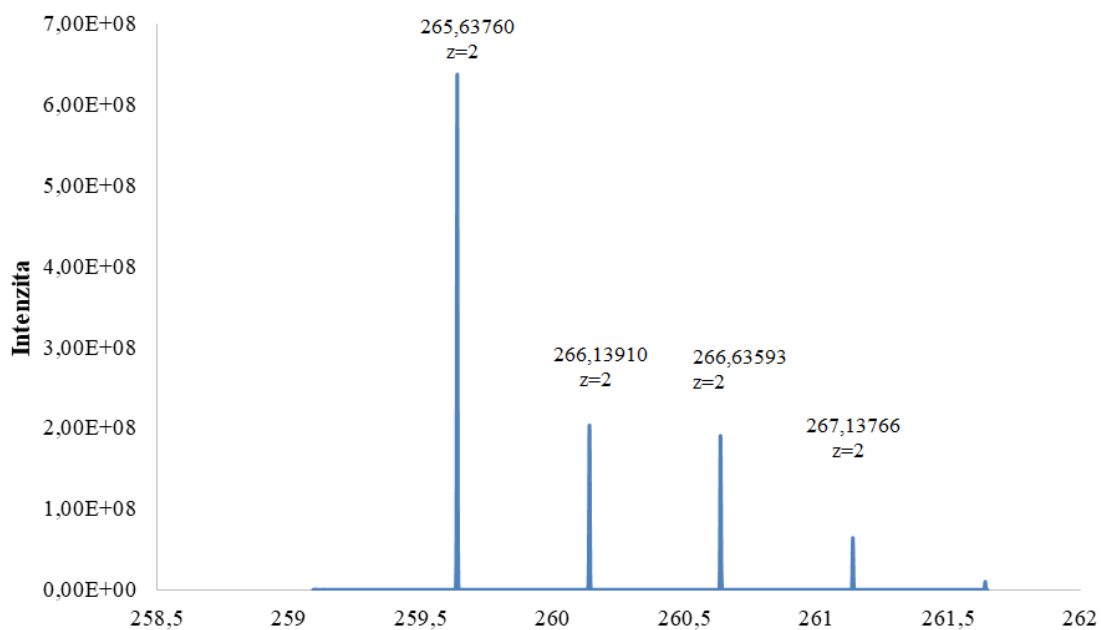
Obr. 25: Přehled hypotetických struktur metabolitů látky K1277 s vyznačením strukturní obměny a vypočítanými i experimentálními hodnotami m/z .

METABOLIT M1

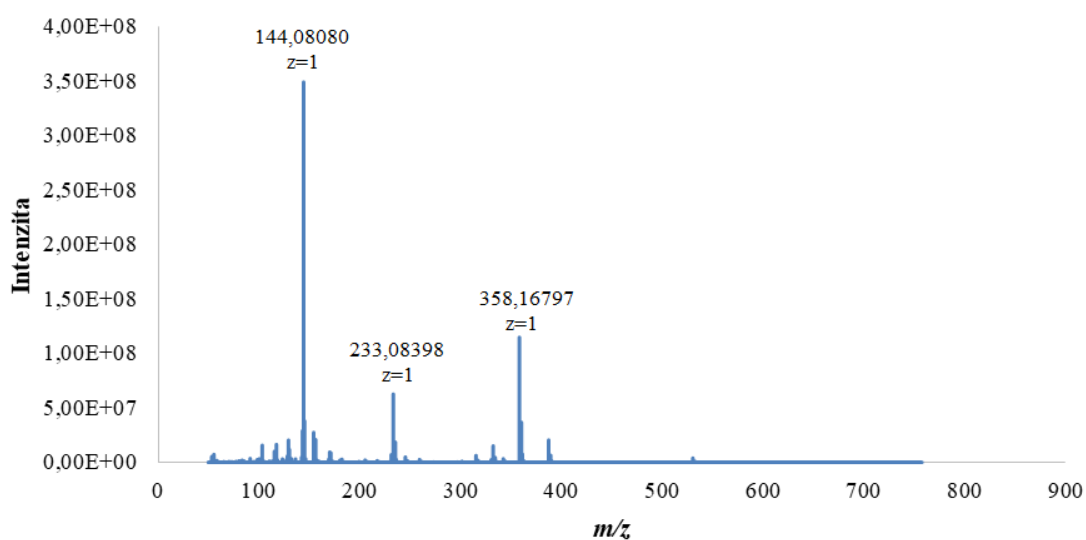
Metabolit M1 s m/z 265,63760 a nábojem +2 eluuje v čase 6,70 min a je nejvíce zastoupeným metabolitem parentní látky K1277 (Obr. 26). Na základě zjištění struktur nejintenzivnějších fragmentů z fragmentačního spektra (Obr. 28) jsme nastínili hypotetickou strukturu tohoto metabolitu. Přehled struktury metabolitu a jeho fragmentů lze vidět na Obr. 29 a 30. Pro kontrolu jsme porovnali i izotopické zastoupení predikovaného metabolitu s experimentálně naměřeným. Izotopová obálka stanovená experimentálně je zobrazena na Obr. 27.



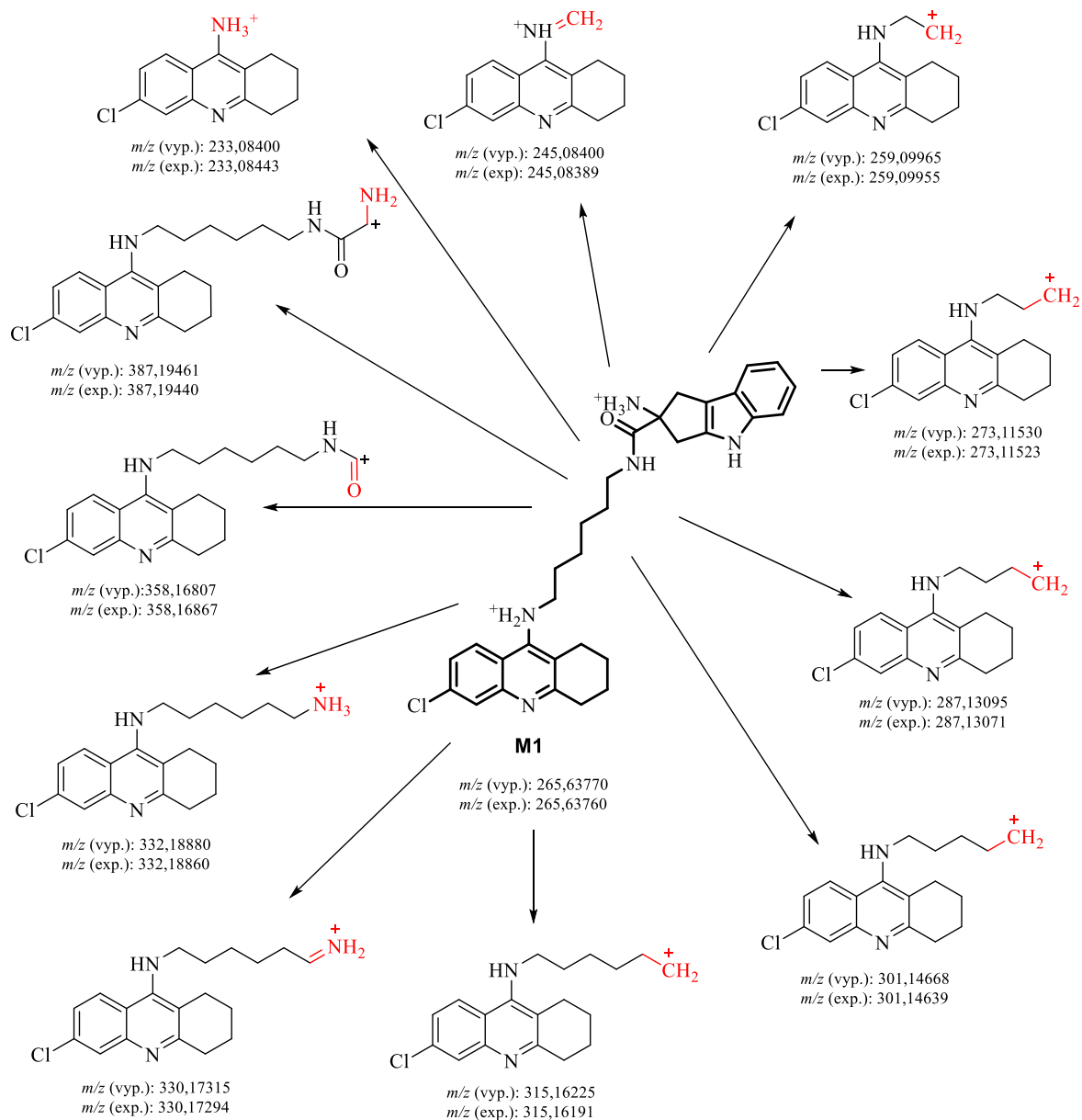
Obr. 26: XIC nejintenzivnějšího metabolitu M1 odpovídající rozmezí $m/z = 265,637 - 265,638$, s retenčním časem 6,70 minuty.



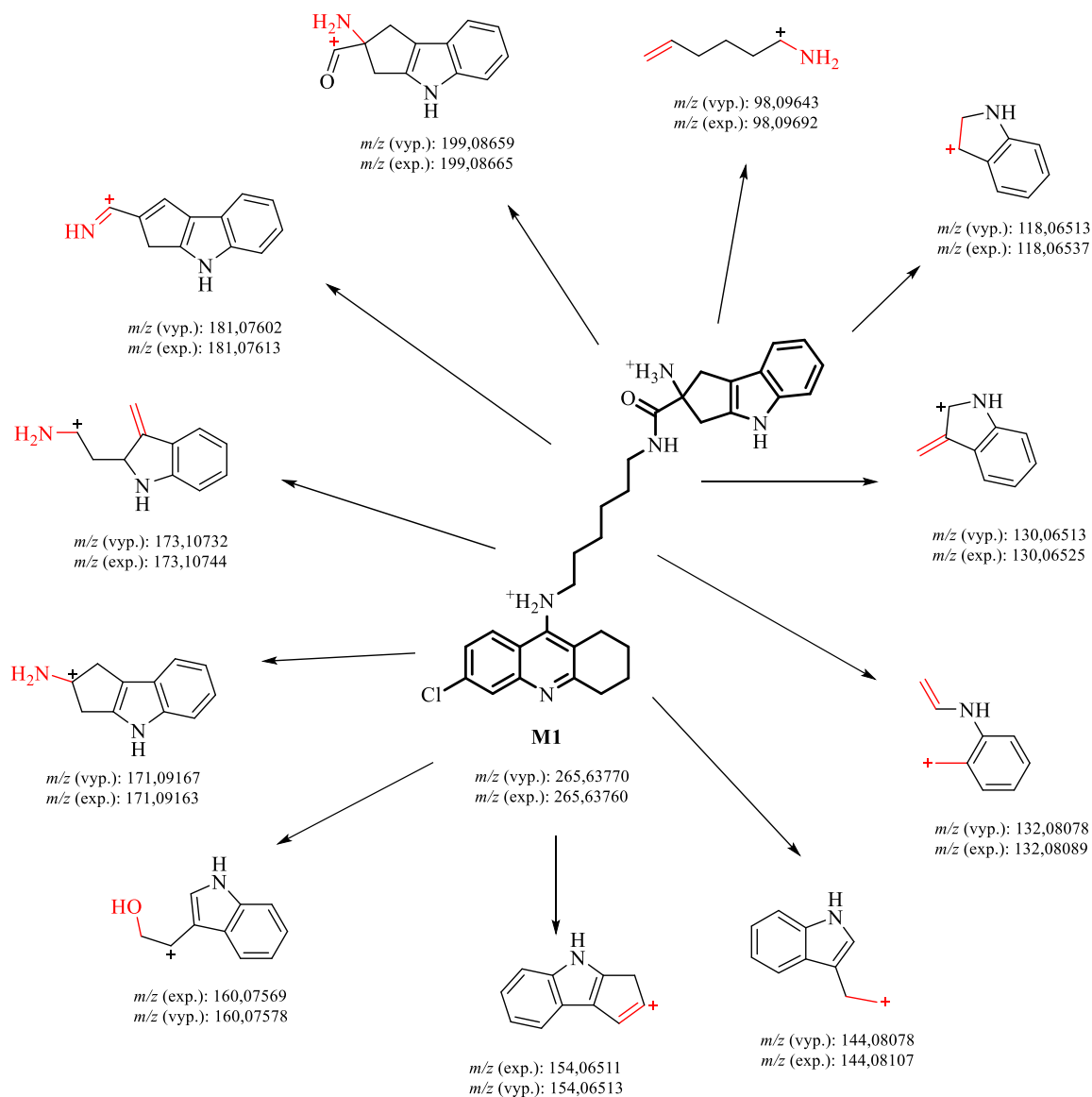
Obr. 27: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M1 zjištěna experimentálně.



Obr. 28: Fragmentační spektrum metabolitu M1 s vyznačenými nejintenzivnějšími ionty.



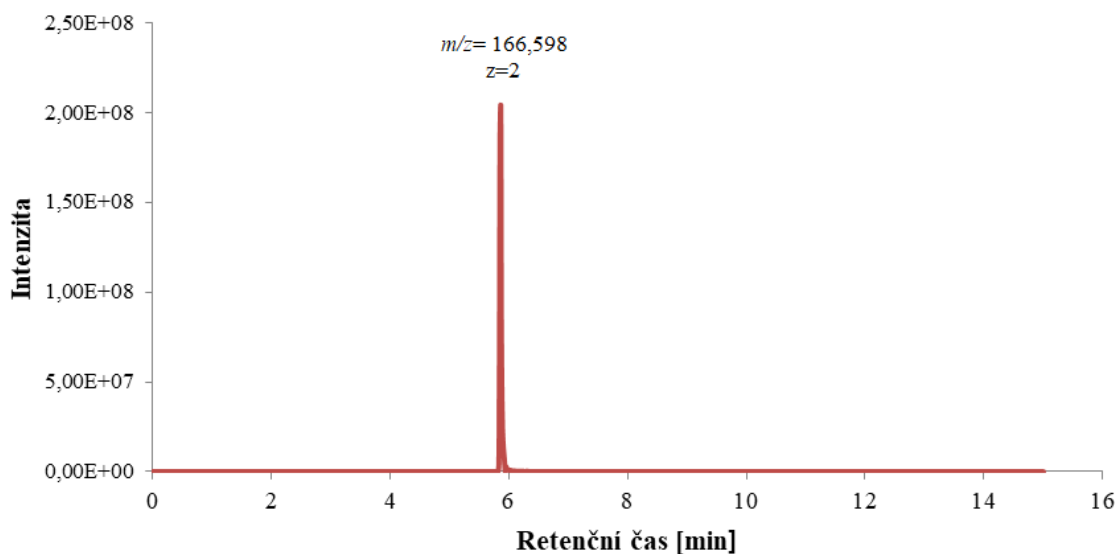
Obr. 29: Přehled hypotetických struktur fragmentů metabolitu M1 odvozených od struktury 6-chlortetrakrinu a vypočítané i experimentálně stanovené hodnoty m/z jednotlivých fragmentů i samotného metabolitu M1.



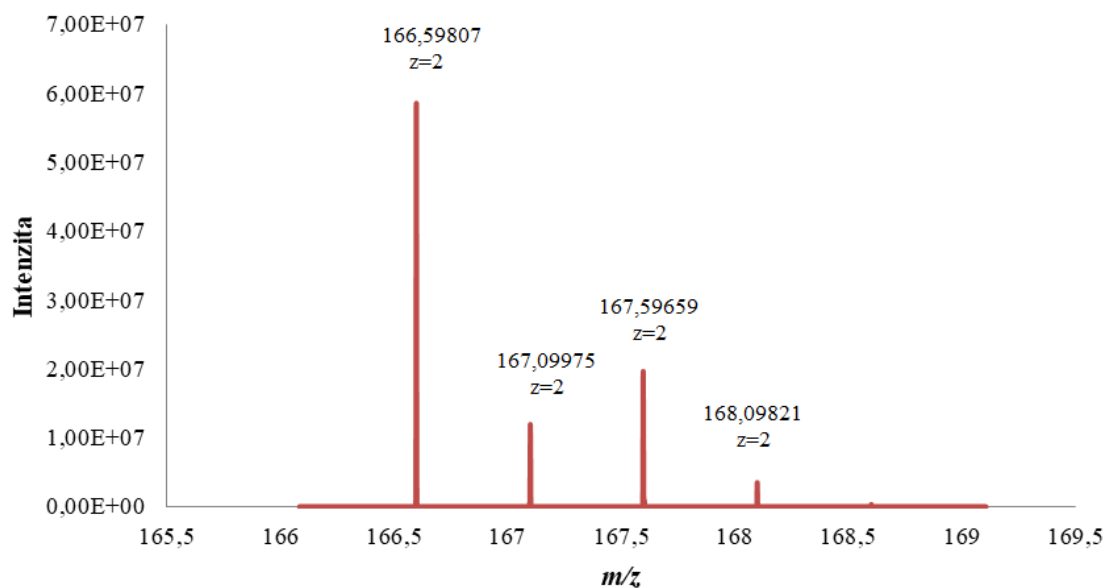
Obr. 30: Přehled hypotetických struktur fragmentů metabolitu 1 odvozených od tryptofanu. Obrázek současně udává i hodnoty poměru hmoty a náboje z vypočítaných i experimentálních dat.

METABOLIT M2

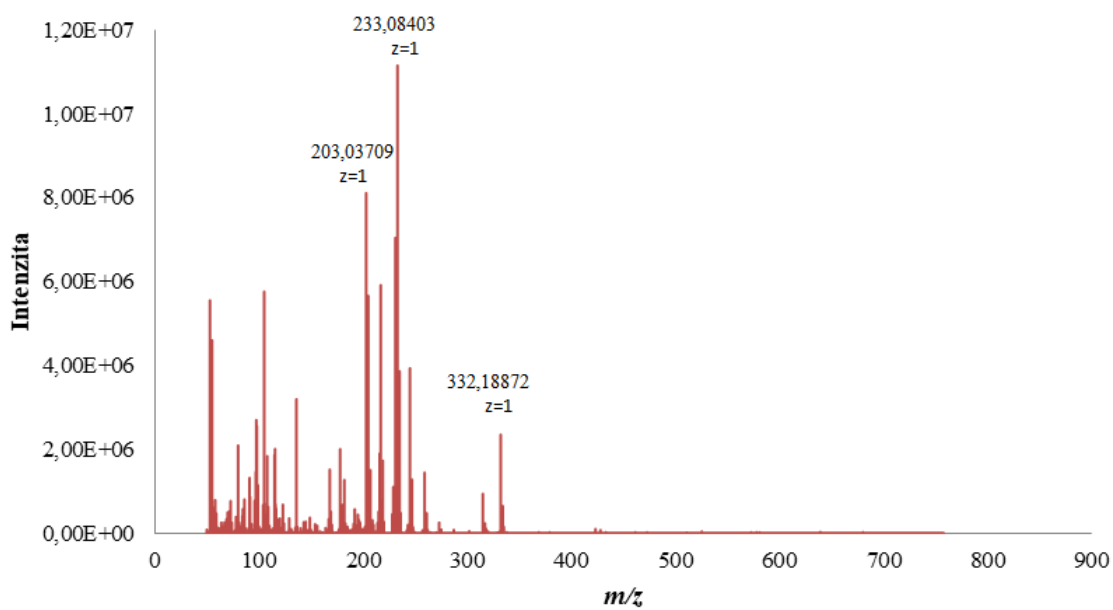
Na Obr. 31 je znázorněn chromatogram metabolitu M2, z kterého lze vyčíst jeho m/z 166,598, náboj +2 a retenční čas, který je 5,85 minuty. Jedná se tedy o polárnější metabolit než je parentní struktura. Dle jeho fragmentačního spektra (Obr. 33) jsme identifikovali jednotlivé fragmenty a pokusili se odhadnout i hypotetickou chemickou strukturu metabolitu (Obr. 34). Ta byla potvrzena shodou poměru hmoty a náboje m/z a shodným predikovaným i experimentálním izotopickým složením navržených fragmentů (Obr. 32)



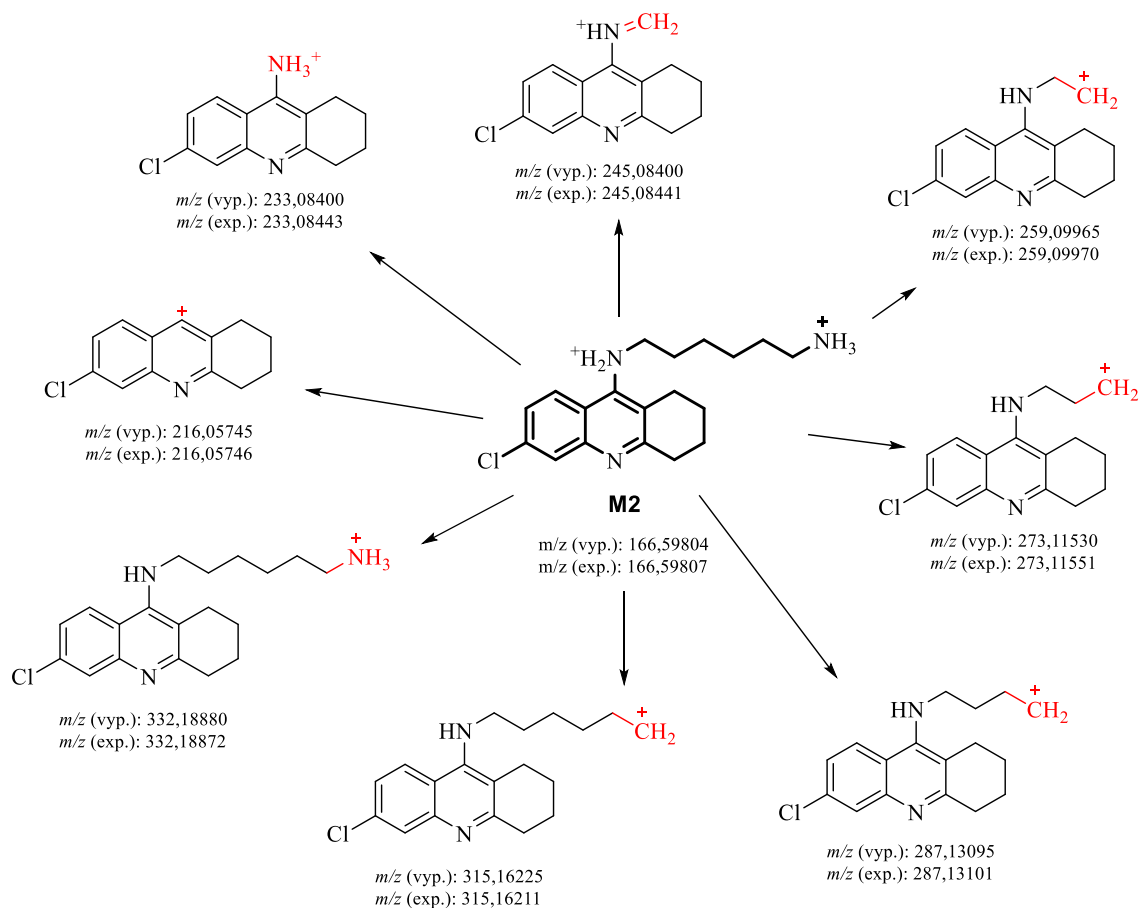
Obr. 31: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) metabolitu M2 odpovídající rozmezí $m/z = 166,598-166,599$. Metabolit se objevuje v retenčním čase 5,85 minuty.



Obr. 32: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M2 stanovena experimentálně.



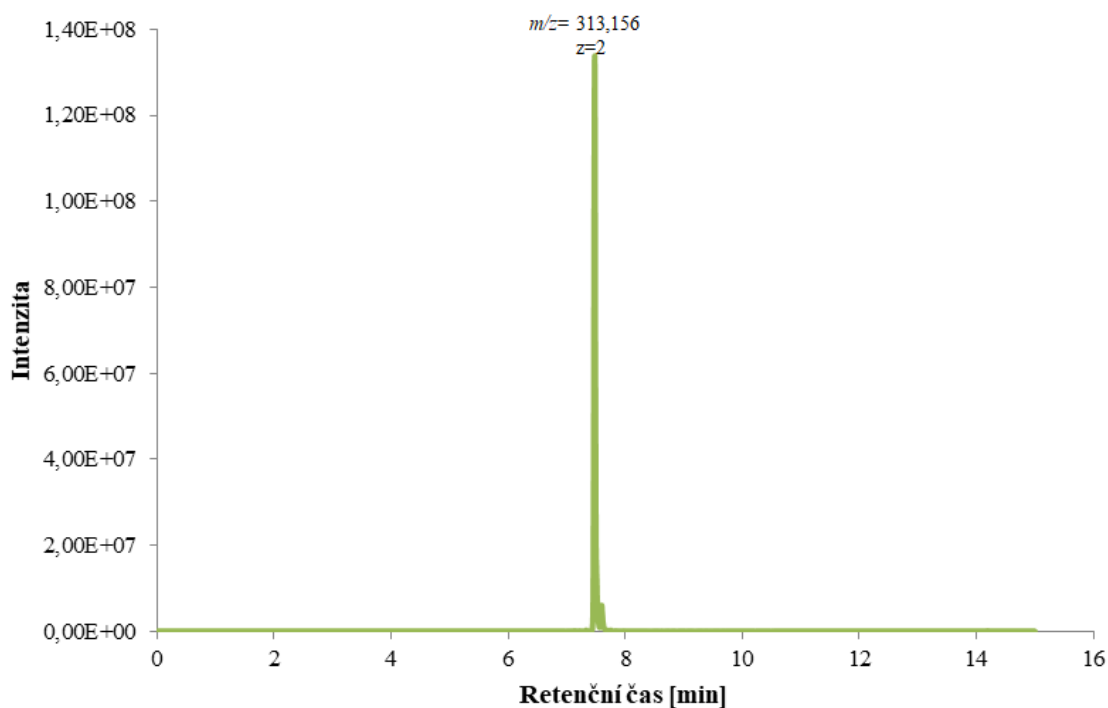
Obr. 33: Fragmentační spektrum metabolitu M2 s vyznačenými nejintenzivnějšími fragmenty.



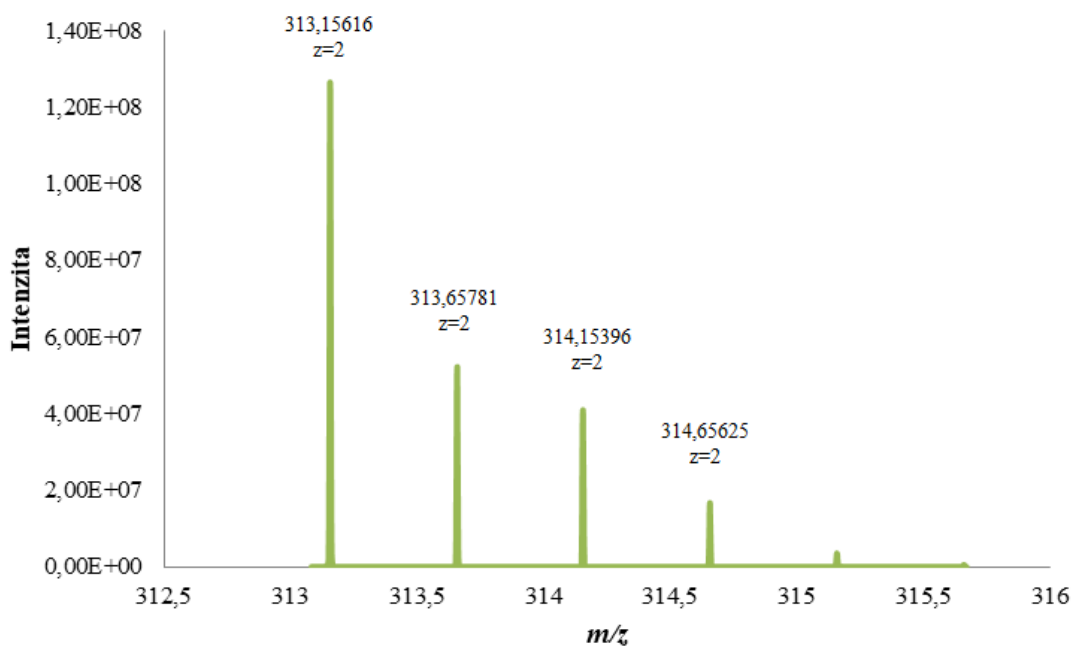
Obr. 34: Přehled hypotetických struktur fragmentů metabolitu M2.

METABOLIT M3

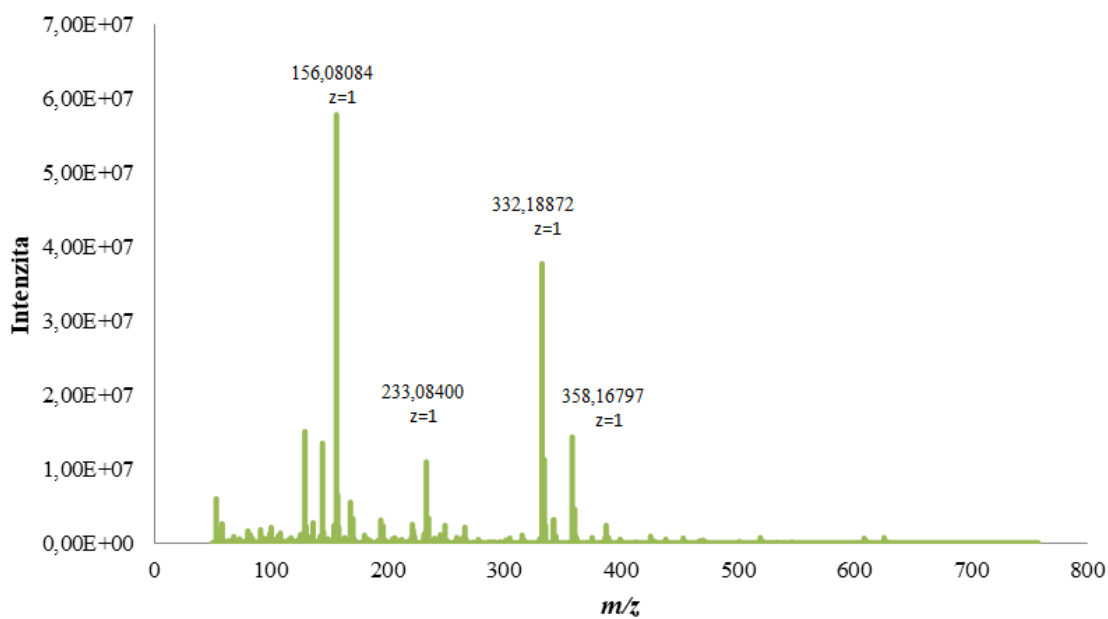
I u třetího metabolitu byl hodnocen jeho iontový chromatogram XIC (Obr. 35), fragmentační spektrum (Obr. 37) a izotopické zastoupení v porovnání s predikovanými hodnotami (Obr. 36). Na základě výše zmíněných parametrů byla určena předpokládaná struktura metabolitu M3, kterou lze nalézt na Obr. 38 a 39. Na těchto obrázcích jsou také vyobrazeny struktury jednotlivých fragmentů.



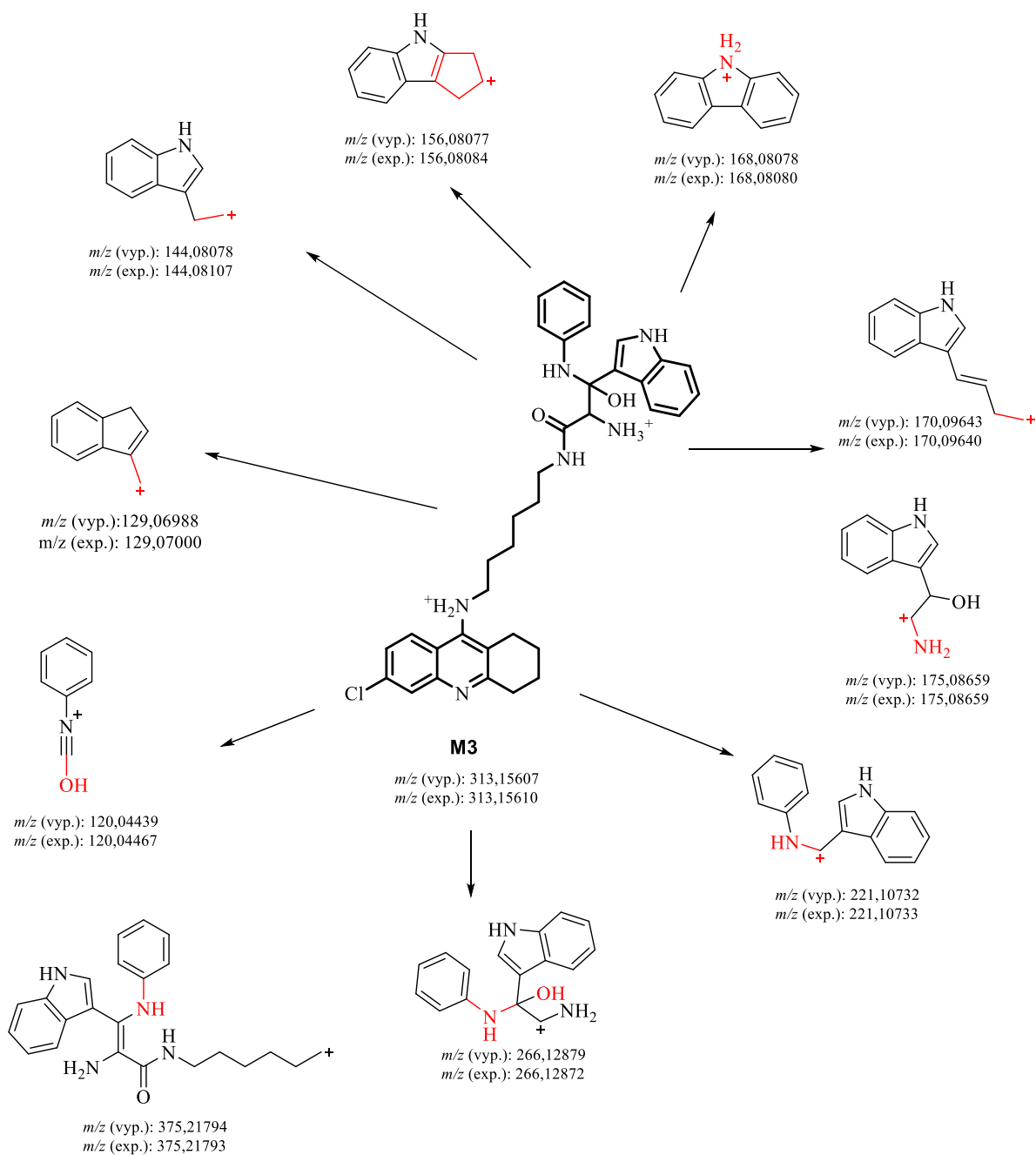
Obr. 35: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) metabolitu M3 odpovídající rozmezí $m/z = 313,156 - 313,157$. Metabolit eluuje v retenčním čase 7,49 minuty.



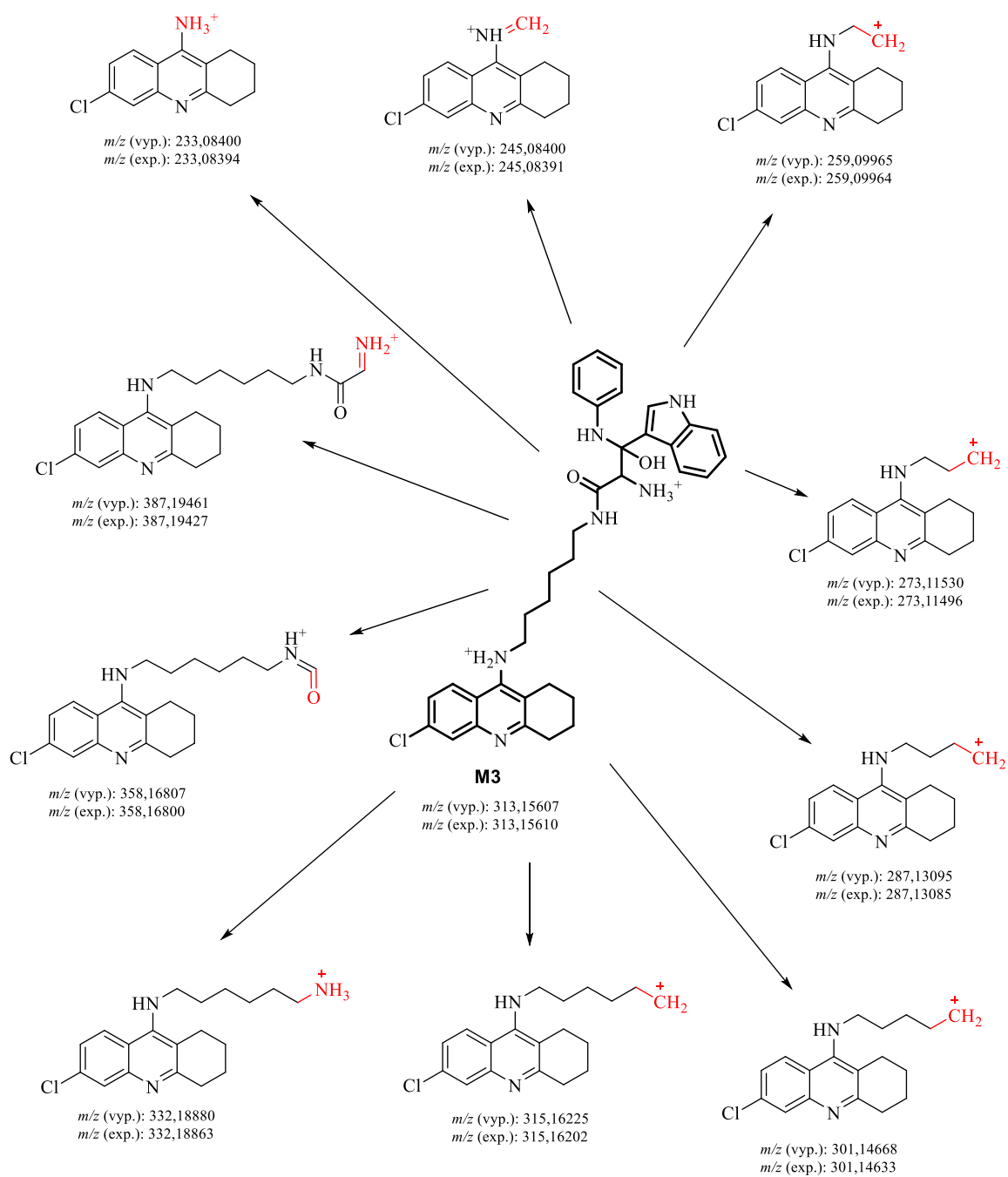
Obr. 36: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M3, s vyznačenými jednotlivými izotopy a jejich intenzitami.



Obr. 37: Graf znázorňující všechny fragmenty vzniklé fragmentací metabolitu M3. U nejintenzivnějších fragmentů je zaznamenáno také jejich m/z



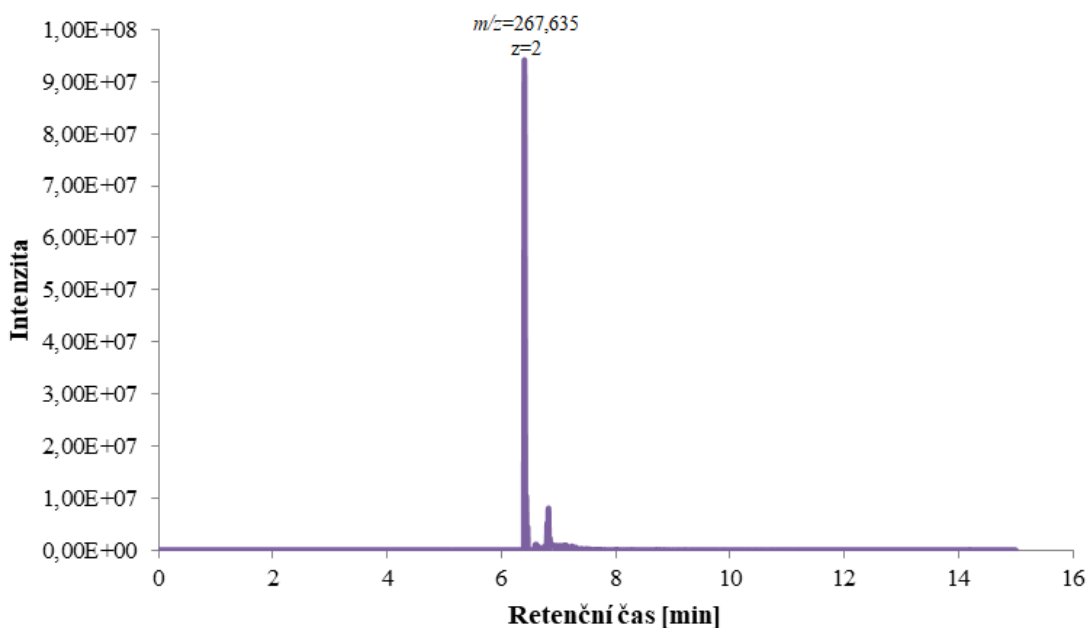
Obr. 38: Znáornění hypotetických struktur fragmentů metabolitu M3 odvozených od tryptofanové části se zobrazením hodnot jejich experimentálně stanovených m/z v porovnání s predikovanými.



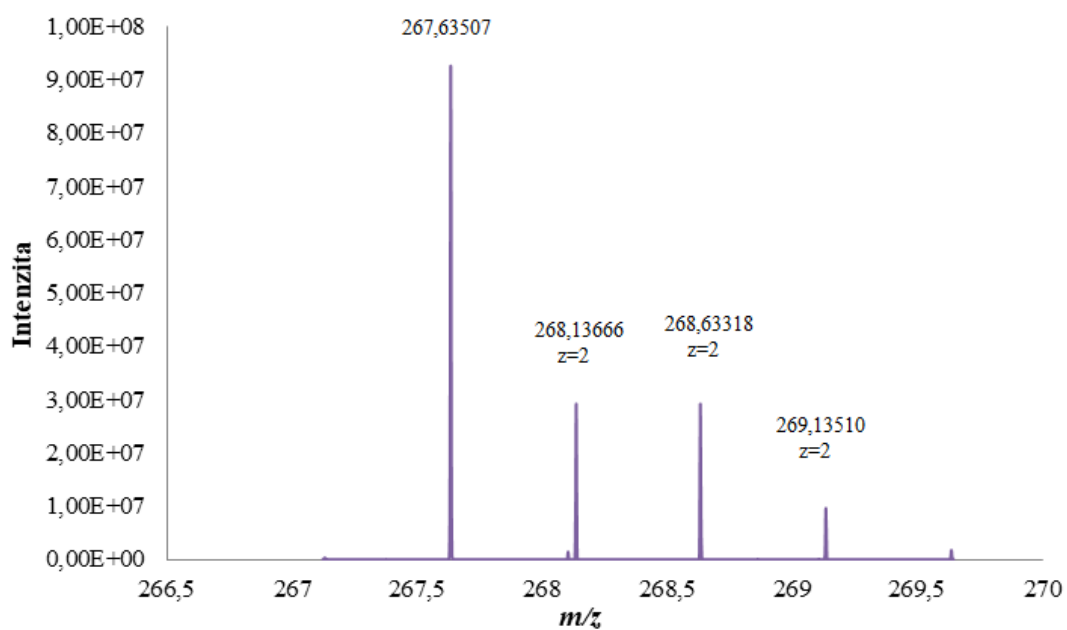
Obr. 39: Záznam hypotetických struktur fragmentů metabolitu 3 od chlortakrinové části a jejich m/z .

METABOLIT M4

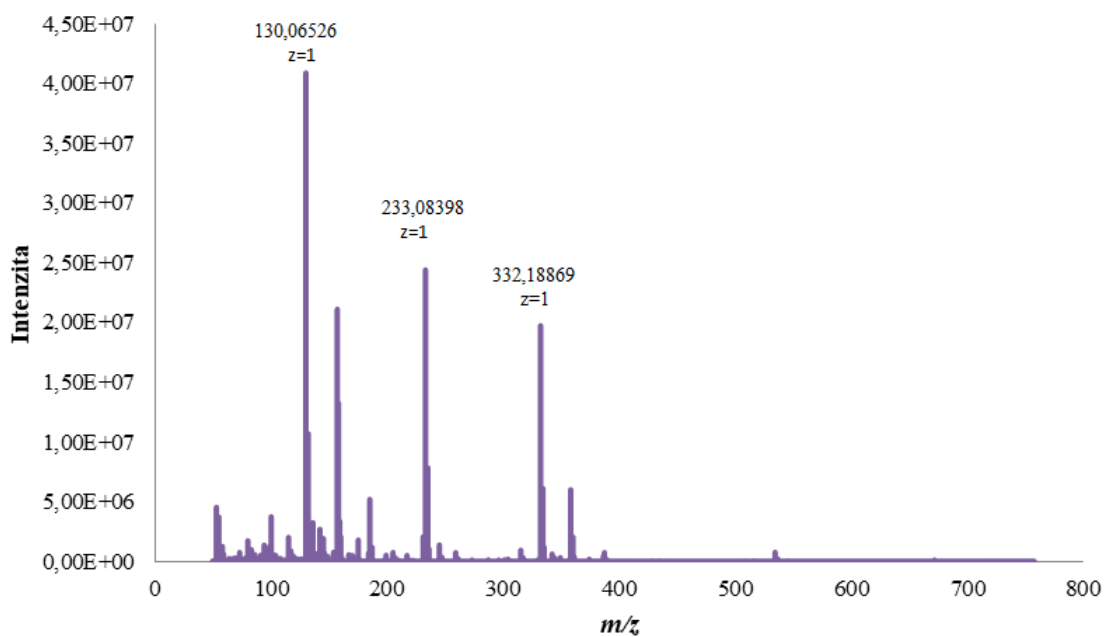
Obdobně jako u předchozích metabolitů byly zjištěny charakteristiky metabolitu M4 v podobě iontového chromatogramu (Obr. 40), izotopové obálky (Obr. 41) a fragmentačního spektra (Obr. 42). Na základě těchto parametrů byly určeny hypotetické struktury fragmentů i samotného metabolitu, které lze vidět na Obr. 43 a 44.



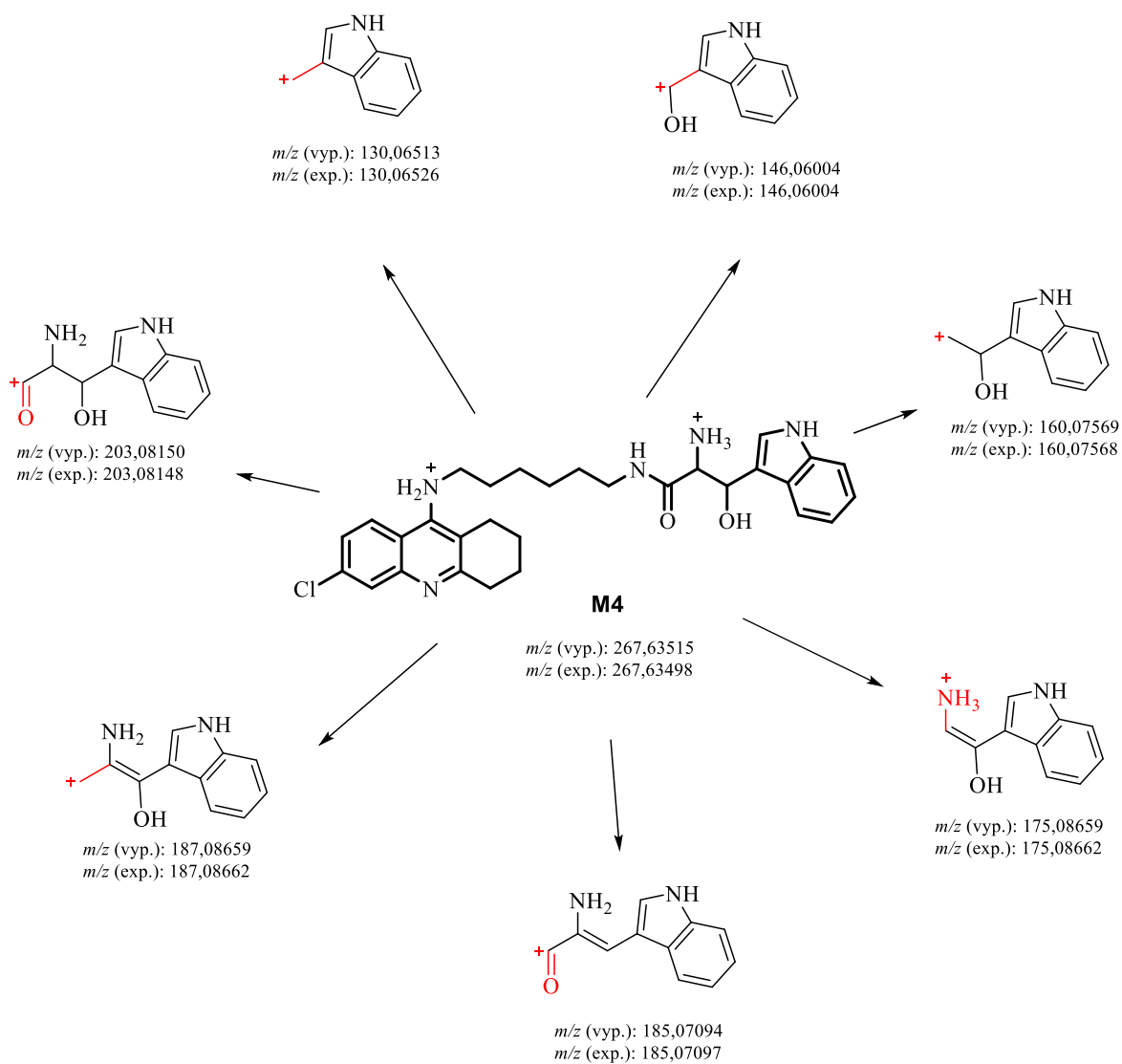
Obr. 40: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) metabolitu M4 odpovídající rozmezí $m/z = 267,635 - 267,636$. Metabolit eluuje v retenčním čase 6,41 minuty. V chromatogramu lze spatřit další píky, které svědčí o možnosti jiných izomerů stejného sumárního vzorce a m/z .



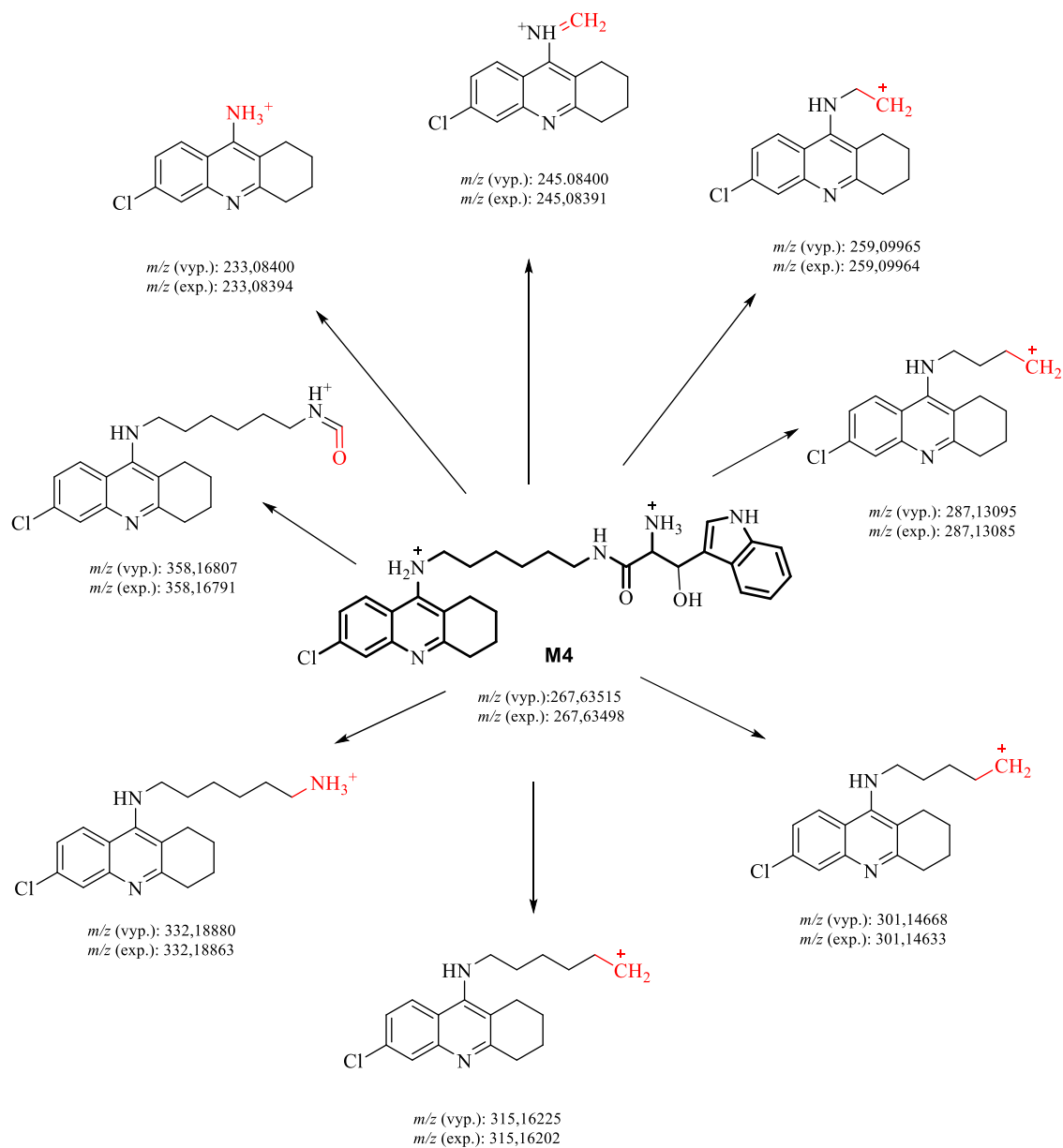
Obr. 41: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M4.



Obr. 42: Fragmentační spektrum metabolitu M4 se zvýrazněnými hlavními fragmenty doplněnými o jejich m/z.



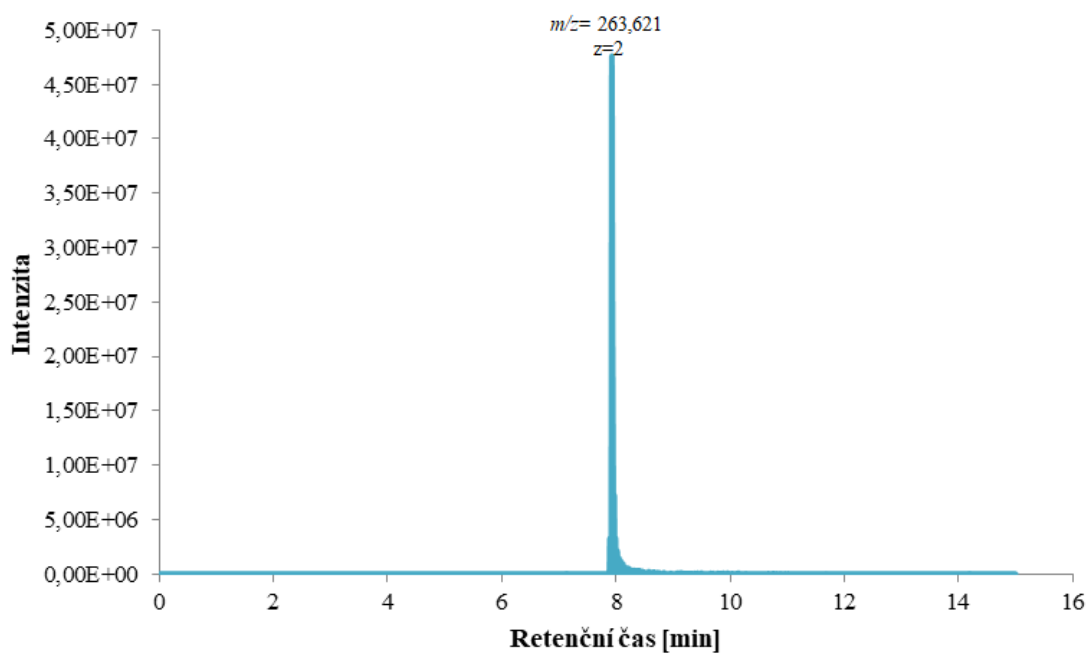
Obr. 43: Přehled hypotetických struktur fragmentů metabolitu M4 odvozených od tryptofanu s jejich m/z .



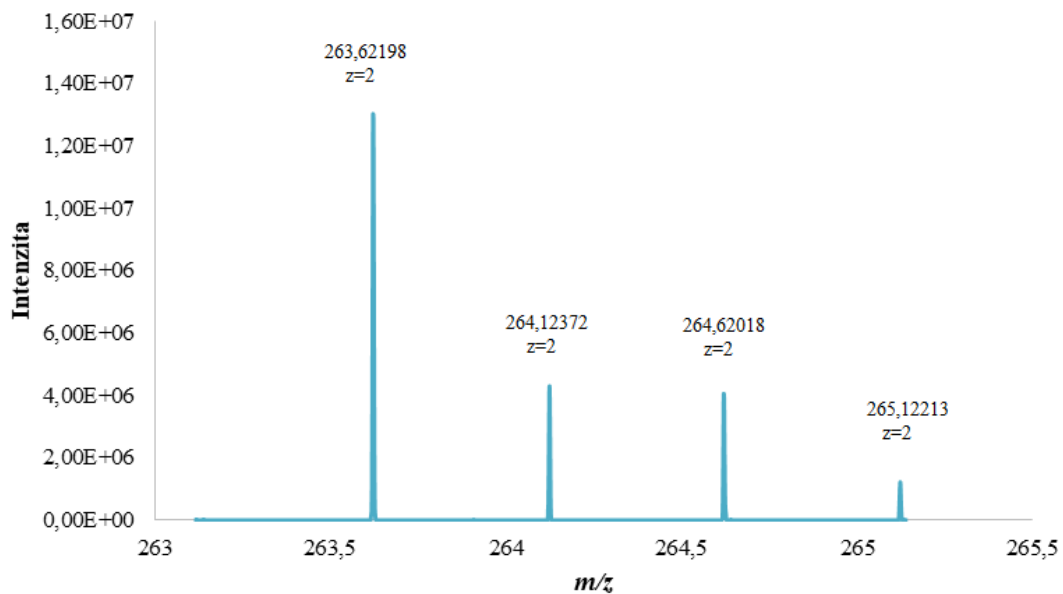
Obr. 44: Hypotetické struktury fragmentů metabolitu M4 odvozené od chlortakrinu s uvedenými vypočítanými i experimentálními hodnotami m/z .

METABOLIT M5

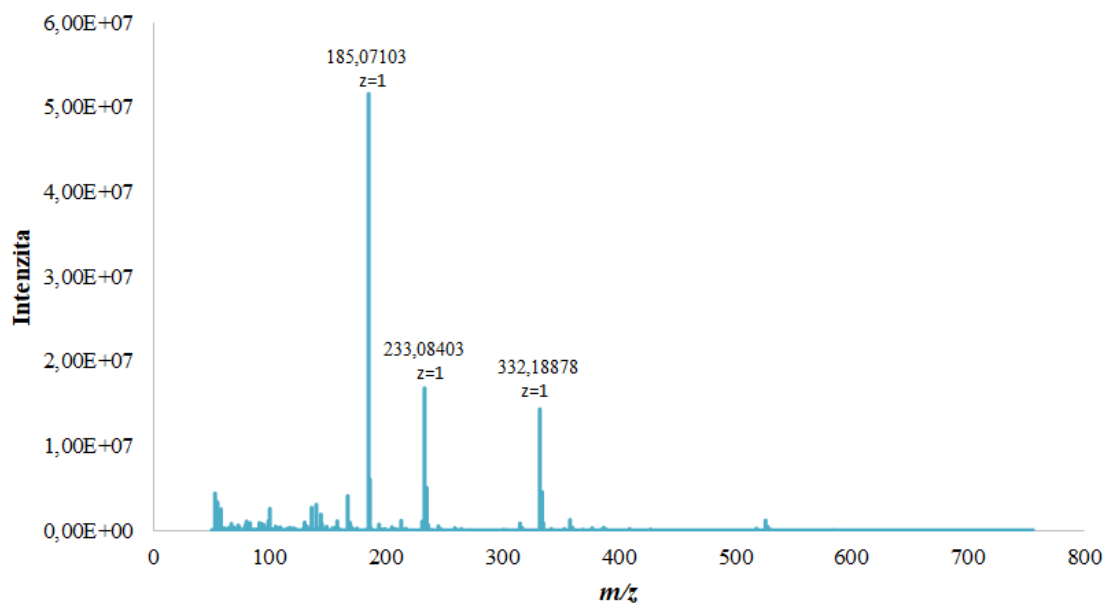
Metabolit M5 je méně polárním metabolitem látky K1277, eluuje až v čase 7,91 minuty (Obr. 45). Dle jeho fragmentačního spektra (Obr. 47) a jejich izotopického zastoupení (Obr. 46) byly stanoveny hypotetické struktury fragmentů. Spolu se strukturou metabolitu jsou znázorněny na Obr. 48 a 49.



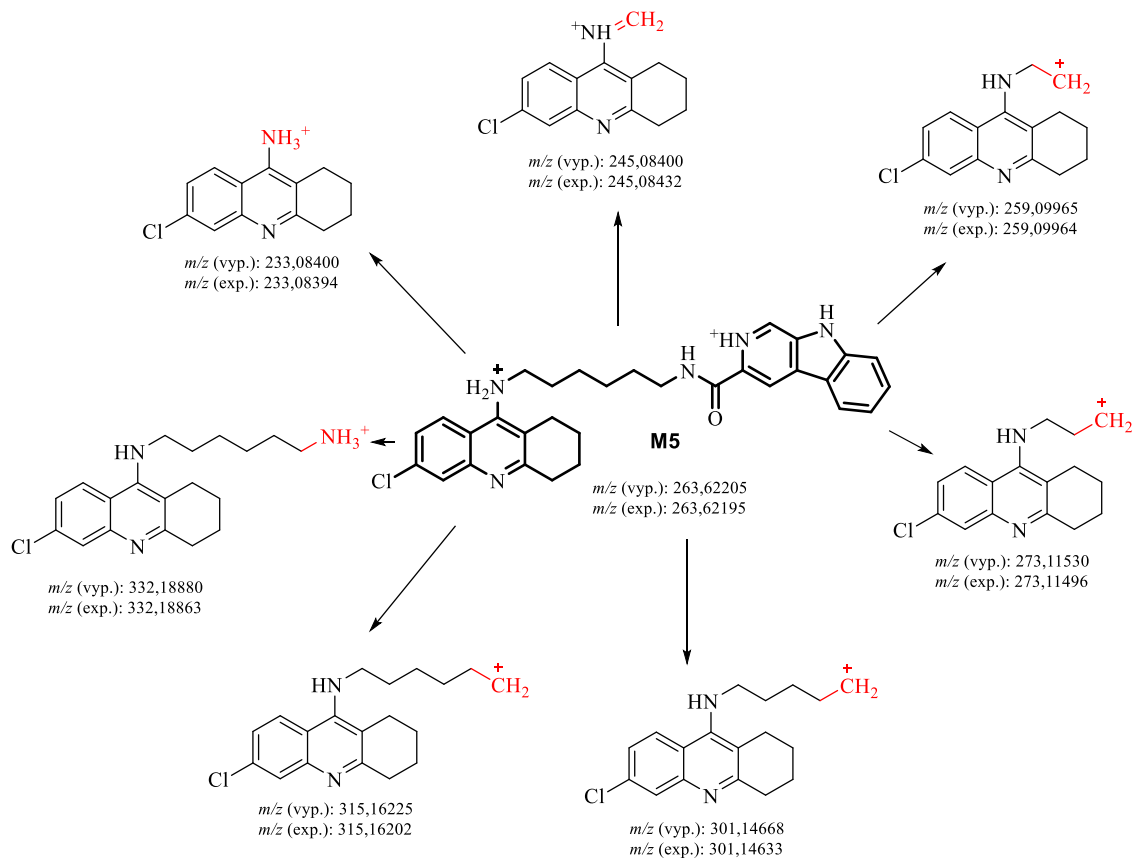
Obr. 45: XIC metabolitu M5 odpovídající rozmezí $m/z = 263,621 - 263,622$. Metabolit eluuje v retenčním čase 7,91 minuty.



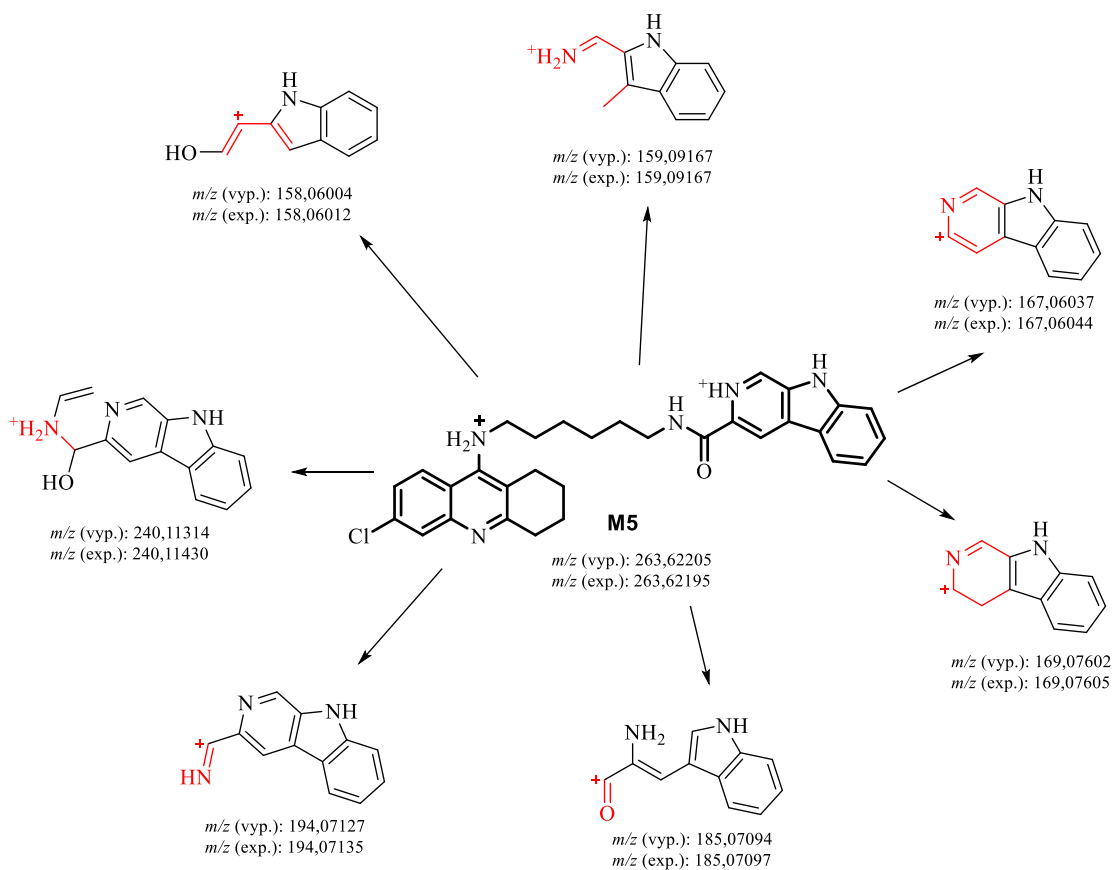
Obr. 46: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M5 stanovena experimentálně.



Obr. 47: Fragmentační spektrum metabolitu M5 s nejintenzivnějšími fragmenty a uvedením jejich m/z .



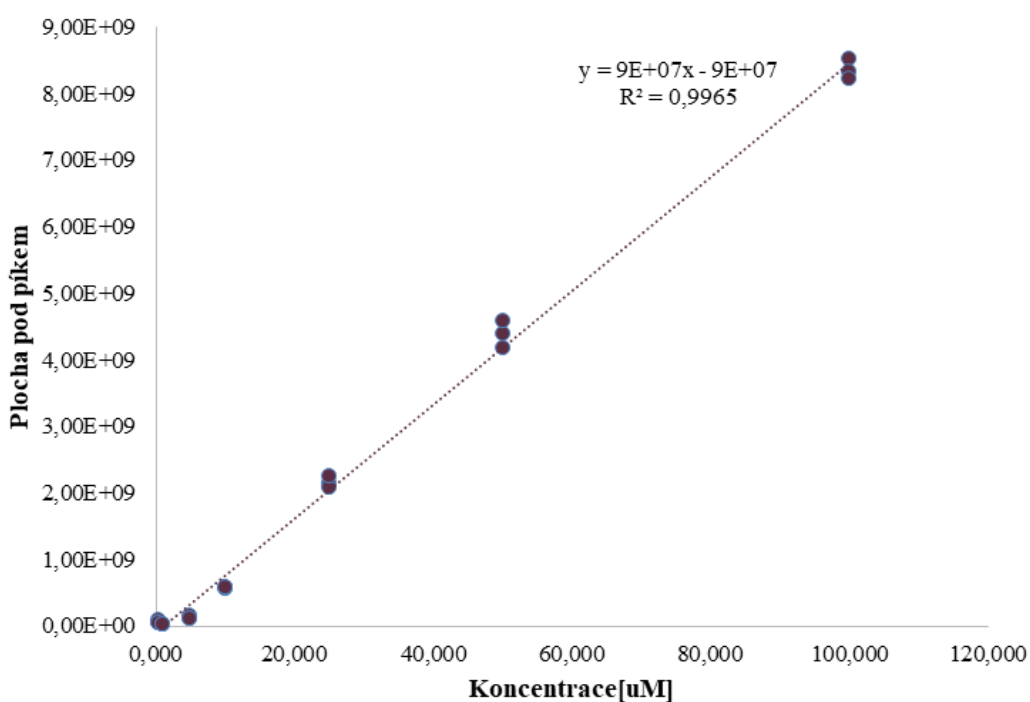
Obr. 48: Znáznornění fragmentů metabolitu M5 s vyznačením jejich poměru hmoty a náboje. Porovnání experimentálních a vypočítaných hodnot.



Obr. 49: Znárodnění fragmentů metabolitu M5 s vyznačením jejich poměru hmoty a náboje. Porovnání experimentálních a vypočítaných hodnot.

6.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Kvantitativní analýza v této diplomové práci byla provedena metodou externího standardu neboli kalibrační přímky. Závislost odezvy detektoru MS na koncentraci poskytla možnost kvantifikovat procentuální úbytek parentní látky a nepřímo též odhadnout množství vzniklých metabolitů. Kalibrační závislost pro látku K1277, stanovenou pro 6člennou kalibrační sérii, lze vidět na Obr. 50.



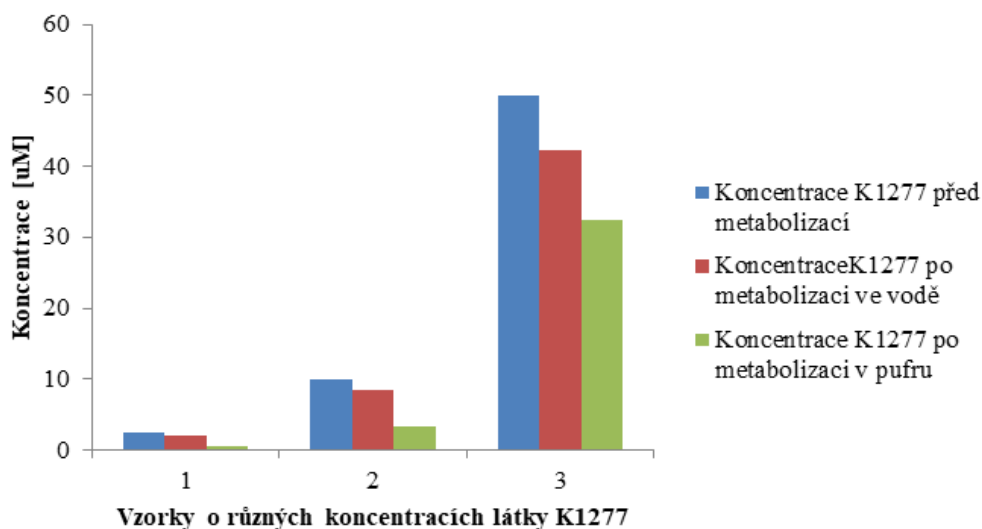
Obr. 50: Kalibrační přímka závislosti plochy pod píkem na koncentraci parentní látky K1277 vytvořena na základě údajů z hmotnostního spektrometru. V horní části grafu je vygenerována rovnice přímky a korelační koeficient udávající míru linearity.

Metabolický experiment s 24hodinovou inkubací byl proveden s rozdílnými médii a ve třech různých koncentracích. LC-MS/MS analýza byla provedena pro každý vzorek 3x a ze stanovených hodnot koncentrací látky K1277 byl vypočítán aritmetický průměr. Úbytek látky K1277 v jednotlivých médiích a při třech různých koncentracích shrnuje Tab. 5.

Nominální konc. látky K1277 před biotransformací [μM]	Konc. K1277 v pufru po biotransformaci [μM]	Konc. látky K1277 v H_2O po biotransformaci [μM]
2,5 (100 %)	0,624 \pm 0,003 (25 %)	2,006 \pm 0,274 (80 %)
10,0 (100 %)	3,328 \pm 0,067 (33 %)	8,437 \pm 0,837 (84 %)
50,0 (100 %)	32,498 \pm 1,435 (65 %)	42,304 \pm 1,123 (85 %)

Tab. 5: Tabulka hodnot nominálních a průměrných koncentrací před a po 24hodinové inkubaci látky K1277 s HLM se směrodatnými odchylkami za použití rozpouštědla vody nebo pufru.

Kvantitativní průběh biotransformace v závislosti na koncentraci látky K1277 a použitém médiu je také znázorněn na Obr. 51.



Obr. 51: Koncentrace látky K1277 ve vzorku před a po biotransformaci ve dvou různých médiích.

Ve srovnání s metodou, při které byla provedena 24hodinová inkubace látky K1277 s HLM, produkovaly ostatní dvě metody s inkubačními časy 1 hodina a 6 hodin mnohem nižší koncentrace metabolitů. V Tab. 6 je znázorněno procentuální zastoupení jednotlivých metabolitů, které bylo stanoveno porovnáním ploch pod píkem v XIC daného metabolitu pro příslušné inkubační časy, přičemž plocha pod píkem odpovídající biotransformaci po 24 hodinách byla vzata jako základ (tj. 100%). Data v Tab. 6 se vztahují k experimentům, kde bylo aplikováno 50 μl K1277 a fosfátový pufr jako medium.

Metaboly	Inkubace 1 hodina	Inkubace 6 hodin	Inkubace 24 hod
M1	0,049 %	0,22 %	100 %
M2	7,62 %	38,90 %	100 %
M3	1,88 %	21,35 %	100 %
M4	3,38 %	21,61 %	100 %
M5	0	0	100 %

Tab. 6: Procentuální zastoupení jednotlivých metabolitů při kratších dobách inkubace ve srovnání s 24 hodinovou inkubací.

7. DISKUSE

Metabolismus potenciálních léčiv je jedním z nejdůležitějších faktorů, který v rámci racionálního vývoje léčiv rozhoduje o použitelnosti léčiva v klinických studiích, a je tedy v rámci preklinického hodnocení léčiv velmi důležitý (Shu et al. 2008). Metabolická studie v této diplomové práci byla provedena s využitím lidských jaterních mikrosomů, které jsou podrobně charakterizovaným *in vitro* modelem biotransformace léčiv s výbornou dostupností a relativně nízkou cenou. Přesto mají však také řadu nevýhod, z nichž ta nejmarkantnější je obtížnost predikovat množství a strukturu metabolitů vzniklých *in vivo* (Asha a Vidyavathi 2010). Jaterní mikrosomy jsou totiž díky diferenciální centrifugaci obohaceny převážně jen o cytochromy a UDP-glukuronosyl transferázy, a chybí tak model vzájemné kompetice s dalšími enzymy, které jsou v kompletním organismu přítomné. Vzhledem k absenci dalších enzymů v HLM nemusí být odhaleny všechny metabolity léčiva, což může způsobit velké rozdíly výsledků kvantitativní i kvalitativní analýzy pro studie *in vitro* a *in vivo*. K metabolismu látek pomocí HLM navíc dochází ve vyšší míře než je tomu u *in vivo* metabolismu nebo u jiných *in vitro* modelů jako jsou například jaterní řezy. Výsledky této práce založené na *in vitro* metabolismu jsou tedy do jisté míry zjednodušené, a nemohou být považovány za predikci metabolismu *in vivo* (Brandon 2004).

Vzhledem k tomu, že inkubační doby léčiv s mikrosomy se velmi často pohybují v intervalu mezi 0 – 120 minutami, byl metabolický experiment nejprve proveden inkubací látky s HLM po dobu jedné hodiny (Foti a Fisher 2004, Nepovimová et al. 2015, Szultka-Mlynska a Buszewski 2016). Po jedné hodině inkubace byly hmotnostním detektorem zaznamenány metabolity M1, M2, M3 a M4 s velmi nízkou koncentrací. Metabolit M5 nebyl zaznamenán s detekovatelnou intenzitou. Dobu inkubace v dalších experimentech jsme proto prodloužili na 6 a 24 hodin. Metabolity při šestihodinové inkubaci byly několikasetkrát intenzivnější v porovnání s intenzitou metabolitů po jednohodinové inkubaci. Vzhledem k nejvyšší intenzitě metabolitů při inkubaci o délce 24 hodin, při které byla intenzita u většiny metabolitů několikatisíctkrát vyšší oproti původní jednohodinové metodě, jsme právě tuto metodu zvolili jako optimální a provedli pomocí ní kvalitativní i kvantitativní analýzu produktů biotransformace. Podobné časy inkubace byly zvoleny také například ve studii Xu et al. 2018. Ve studii Hutzler et al. 2015 se ale setkáváme s názorem, že doba inkubace léčiv s HLM by měla být limitována na dobu jedné hodiny, neboť po delším čase ztrácí

enzymy svou schopnost metabolisovat testovaná léčiva. Z toho plyne náročnost vytvoření metabolického přehledu při této délce inkubace u léčiv, která podléhají metabolismu nespada nebo pomalu, jak je tomu pravděpodobně i u látky K1277. Ačkoli byly do této doby vyvinuty moderní technologie, kterými je možné dobu inkubace prodloužit, je potřeba dalších výzkumů a studií, aby bylo dosaženo ideální extrapolace mezi *in vitro* a *in vivo* jaterním metabolismem (Hutzler et al. 2015). Dle článku Jia a Liu 2007 je také možné dobu inkubace prodloužit, pokud je to u některých léčiv nutné, to však za současné paralelní kontroly aktivity enzymů a kontroly léčiva, že nedochází teplotními vlivy k jeho degradaci.

Důležitou roli v této a obecně v každé jiné analytické metodice hraje metoda úpravy vzorku a nastavení softwaru HPLC a MS neboli parametry metody, které jsme nastavili dle Nepovimové et al. 2015, kde byly analyzovány metabolity první fáze biotransformace strukturně velmi podobného takrinového hybridu, jako je K1277. Ačkoli byla metoda úpravy vzorku převzata ze článku Nepovimová et al. 2015, můžeme se s obdobným postupem úpravy vzorku setkat i v jiných studiích, které využívají lidské jaterní mikrosomy jako *in vitro* model jaterního metabolismu (Asha a Vidyavathi 2010). Vzhledem k tomu, že látka K1277 ještě nebyla dosud metabolicky zkoumána, vybrali jsme osvědčenou metodu k prvnímu metabolickému screeningu. Jednalo se o 15minutovou analytickou metodu s gradientovou elucí v pozitivním módu za využití kvadrupól-orbitrapového analyzátoru a hmotnostních záznamů Full MS/AIF a Full MS/dd-MS². Tato analytická metoda LC-MS/MS představuje standardní protokol pro univerzální analýzu malých, lipofilních molekul s bazickými dusíky na reverzní stacionární fázi typu C18 s hmotnostně spektrometrickou detekcí. Další parametry metody jsou shrnuty v Tab. 2 a v Tab. 3 (viz kapitola 5.4.2.). V této metodě byla použita gradientová eluce z toho důvodu, aby došlo k separaci a eluci jak nepolárních tak silně polárních molekul z komplexní biologické matrice a aby byla analýza co nejkratší (Schellinger a Carr 2006). Vzhledem k předpokladu kladného nabití molekul metabolitů jsme provedli analýzu v pozitivním módu. Pro komplexní posouzení metabolitů látky K1277 by však bylo vhodné provést také analýzu v módu negativním. Hmotnostní analyzátor kvadrupól-orbitrapového typu, poprvé představen v roce 2011, představuje dle článku Kumar et al. 2013 výhodnou kombinaci dvou analyzátorů vedoucí k zlepšení citlivosti a robustnosti metody i u vzorků s velmi nízkou koncentrací studované látky v komplexní matrici. Jako záznamy hmotnostního spektrometru jsme použili Full MS/AIF a Full MS/dd-MS², které rovněž představují standardní techniky

pro hmotnostně spektrometrickou analýzu zaměřenou na identifikaci látek. Data z obou typů skenování si v podstatě odpovídala a sloužila ke kontrole správného přiřazení produktových iontů k prekurzorovým iontům. Oba tyto typy skenování se s výhodou využívají u metabolických studií, oba ale také mají řadu nedostatků. Výhodou režimu Full MS/dd-MS² oproti režimu Full MS/AIF je, že zaznamenává hmoty m/z , které mají přímou souvislost s fragmentací mateřského iontu, nevýhodou pak riziko vynechání některého iontu nebo velké množství analyzovaných iontů, které nemusí mít se zkoumaným iontem souvislost (Castro-Perez 2007).

Po optimalizaci doby inkubace HLM a K1277 byla provedena kvalitativní i kvantitativní část metabolické studie. Zaměřím-li se nejdříve na kvalitativní část, bylo hmotnostním spektrometrem zaznamenáno 5 poměrně intenzivních metabolitů látky K1277 (tj. M1, M2, M3, M4 a M5) po 24hodinové inkubaci s HLM. Těchto 5 látek nebylo v kontrolních vzorcích s HLM bez látky K1277 pomocí LC-MS/MS odhaleno. Dva z těchto metabolitů (M2 a M4) byly zaznamenány s retenčními časy nižšími v porovnání s retenčním časem parentní látky K1277, a biotransformací tak vznikly více polární metabolity. Tyto polárnější metabolity byly vzhledem k první fázi metabolismu léčiv a enzymatickému obsahu HLM predikovatelné a vznikly za účelem ochrany tkání a rychlé exkrece léčiva z organismu (Yang et al. 1998). Po 24hodinové inkubaci látky K1277 s HLM vznikly také tři nepředpokládané a zároveň méně polární metabolity v porovnání s parentní látkou. Dva z nich, metabolit M1 s nejvyšší intenzitou ve spektru a metabolit M5 s nejnižší intenzitou ve spektru, vznikly pravděpodobně cyklizací za přemostění pětičlenného tryptofanového jádra v poloze 2 a α -uhlíku methylenovým můstkem. O této chemické změně svědčí jednak vyšší molekulová hmotnost těchto metabolitů ve srovnání s parentní látkou, a dále pak charakter jejich fragmentačních spekter. Cyklizace nepatří mezi typické reakce první fáze metabolismu léčiv, setkat se s ní můžeme ale například také u metabolitů tri-*o*-cresyl fosfátu (Eto et al. 1962). U metabolitu M3 se setkáváme s navázáním nové struktury do polohy β tryptofanového řetězce. Tyto tři poslední překvapivé metabolické přeměny se vymykají běžným schématickým představám o biotransformaci I. fáze, a lze je spekulativně interpretovat jako důsledek komplexních biochemických reakcí mezi parentní strukturou K1277, mikrosomálními enzymy, metabolity a dalšími chemickými látkami přítomnými v mikrosomálním médiu. Při porovnání rozdílu mezi m/z parentní látky a m/z metabolitu s hmotami neutrálních ztrát, které lze vyčíst například v publikaci Levsen et al. 2005, se

u výše zmíněných metabolitů nejedná o konjugaci s žádnou z běžných endogenních molekul, se kterými se můžeme setkat při tvorbě metabolitů druhé fáze.

Struktura metabolitu M1 byla ve full MS charakterizovaná $m/z = 265,637$ ($[M+2H]^{2+}$), které se liší od $m/z = 259,637$ parentní struktury o 6,000 jednotek m/z , což při celkovém náboji molekuly +2 odpovídá přírůstku 12,000, tedy přesně m/z atomu uhlíku. Spektrum produktových iontů zaznamenaných pro $m/z = 265,637$ obsahovalo majoritní ionty $m/z = 144,080$, $m/z = 233,083$ a $m/z = 358,167$. Méně intenzivní produktové ionty $m/z = 154,065$, $m/z = 171,091$ a $m/z = 181,076$ naznačují, že atom uhlíku přibyl v tryptofanové části látky K1277 (Obr. 30). Z dalšího studia fragmentačních spekter a srovnávacích analýz fragmentů tryptofanové části látky K1277 a metabolitu M1 je pravděpodobné, že při biotransformaci v mikrosomálním prostředí mohlo dojít k methyloce za vzniku pětičlenného cyklu spojujícího uhlíkový atom v poloze 2 indolyly a uhlíkový atom α sousedící s karbonylem amidické skupiny. Ačkoli je retenční čas metabolitu M1 vyšší (6,70 min) než retenční čas parentní látky K1277 (6,51 min), a tím tedy potvrzena vyšší lipofilita M1 ve srovnání s K1277, není v tomto okamžiku jasné, jak k methyloce přesně za těchto experimentálních podmínek dochází a který izomer M1 při biotransformaci skutečně vzniká.

Metabolit M2 byl ve Full MS charakterizován $m/z = 166,598$ ($[M+2H]^{2+}$), což se od parentní struktury při náboji +2 liší o 186,078 jednotek. Tento rozdíl může představovat odštěpenou tryptofanovou část bez aminové skupiny. Metabolitem je tedy pravděpodobně skelet 6-chlortakrinu substituovaný alifatickým řetězcem s primární aminovou skupinou na jeho konci. Tuto strukturu dokládají i zaznamenané produktové ionty ve fragmentačním spektru, které vychází pouze z této části 6-chlortakrinové struktury (Obr. 34). Byla identifikována řada produktových iontů od $m/z = 233,084$ samotného 6-chlortakrinu až po $m/z = 332,188$ jednonásobně nabitého metabolitu M2 vždy s rozdílem přírůstku m/z odpovídajícím jedné methylové skupině. V tomto případě se tedy jedná o hydrolyzu parentní struktury K1277 v místě amidové vazby za vzniku kyseliny a primárního aminu. Hydrolytická reakce patří mezi základní reakce I. fáze biotransformace léčiv (Clementi a Fumagali 2012, Lee et al. 1996). Retenční čas tohoto metabolitu 5,85 min. je vzhledem k vyšší polaritě molekuly nižší ve srovnání s parentní látkou. Struktura uvolněné aminokyseliny byla na chromatogramu zaznamenána pouze ve stopovém množství. Pravděpodobně se tak stalo z důvodů nízké stability tryptofanu v systému HLM po 24hodinové inkubaci. Usuzují tak i z faktu, že při metabolismu samotné struktury tryptofanu po 24hodinové inkubaci s HLM,

kteřá také byla provedena, bylo téměř celé množství zmetabolisováno a koncentrace po biotransformaci byla téměř nulová. Pravděpodobně došlo k modifikaci tryptofanu na reaktivní produkty, které mohly reagovat s látkou K1277 za vzniku neobvyklých metabolitů charakterizovaných insercí CH skupiny, anilinového zbytku či zacyklením molekuly.

Metabolit M3 poskytl protonovanou molekulu $[M+2H]^{2+}$ o $m/z = 313,156$. Identifikace v tomto případě byla velmi komplikovaná, neboť rozdíl hodnot m/z metabolitu od parentní struktury činil 107,038 jednotek a látka se navíc eluovala s vyšším retenčním časem 7,49 min oproti retenčnímu času parentní látky 6,51 min. naznačující jeho vyšší lipofilitu. Majoritními produktovými ionty byly ionty s $m/z = 156,080$, $m/z = 233,084$, $m/z = 332,188$, $m/z = 358,167$. Z těchto produktových iontů nebylo možné usuzovat na žádnou obměnu parentní struktury spadající mezi běžné metabolické změny I. fáze biotransformace. Až při dalším a podrobnějším studiu fragmentačních spekter a odhalení produktových iontů o $m/z = 221,107$, $m/z = 266,128$ a $m/z = 375,217$ a po provedení srovnávacích analýz fragmentů tryptofanové části látky K1277 a metabolitu M3 se nám podařilo navrhnout chemickou strukturu s hodnotou $m/z = 313,156$, která svými chromatografickými vlastnostmi odpovídá vlastnostem metabolitu M3. K odhalení chemické struktury M3 dopomohly i produktové ionty takrinové části molekuly, u kterých nebyla zaznamenána žádná obměna. U tohoto metabolitu se tak pravděpodobně jedná o modifikaci parentní struktury navázáním anilinového fragmentu a hydroxyskupiny do β polohy tryptofanového řetězce. Troufám si říci, že jde o velmi netradiční obměnu parentní struktury v první fázi metabolismu a pravděpodobně k ní došlo vlivem komplexního působení látek ve vzorku s mikrosomálním prostředím. Nelze vyloučit ani možnost kontaminace struktury molekulou již fragmentovanou v předchozím kroku.

Protonovaná molekula metabolitu M4 $[M+2H]^{2+}$ byla ve Full MS charakterizována $m/z = 267,635$ a v porovnání s m/z parentní struktury se tak liší o 8,000 jednotek, které při nabití molekuly +2 představují 16,000 jednotek. Z výše uvedených informací a z vygenerovaného sumárního vzorce metabolitu je tedy možné uvažovat o obsahu atomu kyslíku oproti parentní látce. Naznačuje tomu i vyšší polarita metabolitu oproti parentní látce, neboť jeho retenční čas 6,41 min. je nižší než retenční čas parentní struktury. Metabolit M4 byl spekulativně označen jako hydroxylovaná látka K1277. Z produktových iontů o $m/z = 146,060$, $m/z = 160,075$, $m/z = 187,086$ a $m/z = 203,081$ a vzhledem k absenci produktových iontů s navázaným hydroxylem

v takrinové části molekuly, lze usuzovat na vazbu hydroxyly v poloze β -tryptofanového řetězce. Analýzou fragmentačního spektra metabolitu M4 byla nalezena kompletní řada homologických fragmentů 6-chlortakrinu s alkylovou skupinou navázanou na aminoskupině v poloze 9. Hydroxy skupina byla odhalena ve fragmentech odpovídajících tryptofanové části látky K1277. Hydroxylace parentní látky je častou reakcí první fáze biotransformace spadající mezi reakce oxidační (Clementi a Fumagali 2012, Lee et al. 1996).

Porovná-li hydroxylaci metabolitu M4 se známými metabolity samotné struktury takrinu, lze si povšimnout jiného místa navázání hydroxyly. U takrinu byl nejintenzivnějším metabolitem zaznamenán metabolit s hydroxylovou skupinou v poloze 1 na aromatickém jádře. Vzhledem k reaktivitě metabolitů s hydroxylovaným jádrem a jejich toxicitě pro organismus byla u látky K1277 zvolena jako strukturní základ molekula 6-chlortakrinu, která stericky brání navázání hydroxyly do těchto poloh (Patočka et al. 2008). Pravděpodobně z tohoto důvodu došlo u metabolitu M4 látky K1277 k navázání hydroxyly do spojovacího řetězce, a nikoli na aromatické jádro. Analogicky proběhla hydroxylace u hybridu 6-chlortakrin-trolox (Nepovimová et al. 2015). Lze proto konstatovat, že 6-chlortakrinový zbytek je vůči biotransformaci v mikrosomálním prostředí poměrně stabilní a chemickým změnám podléhá spíše jiné části molekul takrinových hybridů.

Metabolit M5 v protonované formě $[M+2H]^{2+}$ byl charakterizován ve full MS hodnotou $m/z = 263,621$. Při porovnání s parentní látkou je patrný rozdíl 4,000 jednotek a vzhledem k náboji +2 celkový rozdíl 8,000 jednotek. Z tohoto a opět i z důvodu větší lipofility metabolitu M5 oproti parentní látce, neboť retenční čas metabolitu je 7,91 min, bylo rovněž komplikované tuto strukturu identifikovat. Na základně produktových iontů z tryptofanové části o $m/z = 167,060$; $m/z = 169,676$ a $m/z = 240,113$ lze předpokládat inserci CH skupiny a zacyklení molekuly v poloze 2 indolového skeletu a primární aromatické skupiny v poloze α -tryptofanového řetězce.

Co se týče metabolismu tryptofanové části molekuly, nebyly u látky K1277 pozorovány žádné destruktivní změny indolového skeletu v porovnání se znalostmi o *in vivo* metabolismu tryptofanu (Palego et al. 2016).

Všechny produktové ionty fragmentačních spekter byly porovnány s produktovými ionty predikovanými programem Mass frontier, který se běžně používá a který byl ke stejnému účelu použit také při analýze metabolitů potenciálního léčiva v léčbě obezity (Edlund a Baranczewski 2004). K potvrzení všech navržených

chemických struktur metabolitů by však bylo nutné jednotlivé metabolity separovat a stanovit jejich strukturu pomocí analytických identifikačních metod, jako je NMR nebo rentgenostrukturní analýza (Kruk et al. 2017, Musilová a Gratz 2011). Vzhledem k tomu, že výše zmíněné metabolity nemají prozatím své autentické standardy, nelze jejich identitu potvrdit srovnáním chromatografických podmínek (jako je retenční čas, hmota metabolitu a hmota jeho produktových iontů) zjištěného metabolitu s pravým standardem, jak se s tímto postupem identifikace metabolitů můžeme setkat u jiných studií (Bártíková et al. 2012, Hroch et al. 2012, Link 2007).

V rámci kvantitativní analýzy bylo prokázáno, že se látka poměrně málo metabolisuje po jednodinové i šestihodinové inkubaci s HLM, a lze z toho usuzovat na její relativně vysokou stabilitu (Hutzler et al. 2015). K hodnocení byla využita metoda vnějšího standardu za pomoci kalibrační křivky. Korelační koeficient udávající míru linearity byl vypočítán z údajů vygenerovaných hmotnostním spektrometrem. Hodnota koeficientu determinace byla stanovena na hodnotu $R^2 = 0,9965$. Na základě kalibrační rovnice došlo k přepočtu jednotlivých koncentrací parentní látky po biotransformaci s HLM a k porovnání s výchozími koncentracemi látky K1277 před biotransformací (Tab. 5). Lze si povšimnout rovněž rozdílu biotransformace na základě zvoleného média pro rozpouštění. V případě pufru byla biotransformace látky intenzivnější v porovnání s rozpouštěním látky ve vodě. V případě původní koncentrace látky K1277 2,5 μM rozpuštěné ve vodě činil úbytek látky K1277 neboli její zmetabolisované množství po 24hodinové inkubaci 20 % původní koncentrace. V porovnání s látkou metabolisovanou s HLM po rozpouštění v pufru byl úbytek přibližně 3x vyšší. U hodnoty původní koncentrace 10,0 μM představoval úbytek metabolisované látky rozpuštěné ve vodě téměř 16 %. V porovnání s metabolisovanou látkou rozpuštěnou v pufru byl úbytek opět vyšší asi 4x. U původní koncentrace 50 μM bylo metodou kalibrační přímky vypočítané množství zmetabolisované látky po rozpouštění ve vodě přibližně 15 % původní koncentrace. V porovnání s látkou rozpuštěnou v pufru je množství metabolisované látky přibližně poloviční.

8. ZÁVĚR

Studie provedená v rámci této diplomové práce zahrnovala provedení metabolického experimentu s látkou K1277 v prostředí HLM a následné stanovení vzniklých metabolitů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie. Látka K1277, strukturní hybrid léčiva takrinu a aminokyseliny tryptofanu, představuje potenciální léčivo AD. Jedná se o dosud nepublikovanou, novou chemickou entitu, a tato práce předkládá neznámé metabolické vlastnosti této látky. Primární problematikou, kterou bylo nutné se zabývat, bylo provedení metabolického experimentu s HLM. Ukázalo se, že hlavním faktorem, který podporuje vznik metabolitů, je doba inkubace. Bylo zjištěno, že látka K1277 podléhá biotransformaci s HLM po 24 hodinách v porovnání s kontrolními vzorky, které obsahovaly pouze HLM, poměrně pomalu. Metabolické experimenty provedené po dobu 1 a 6 hodin při teplotě 37 °C a za podpory třepání poskytly pouze stopy metabolitů, které bylo obtížně pomocí LC-MS/MS analyzovat. Další studovanou problematikou byla chemická stránka biotransformace 1. fáze látky K1277. Studie nastiňuje 5 hypotetických struktur nejintenzivnějších metabolitů v TIC chromatogramu. Ze strukturních obměn bylo možné pozorovat cyklizaci v případě metabolitu M1 a M5, navázání zcela nové struktury anilinu u metabolitu M3, hydroxylaci u metabolitu M4 a hydrolýzu amidové vazby u metabolitu M2. Pro potvrzení těchto struktur by bylo nutné dále provést dodatečné analýzy popřípadě separaci metabolitů a NMR. Současně se v rámci této práce kvantifikovalo množství zmetabolisované K1277 po inkubaci s HLM, které činilo u látky rozpuštěné ve vodě přibližně 15–20 % původní koncentrace. Při rozpuštění látky v pufru byl úbytek zpravidla 2–4 x větší.

Závěrem lze tedy říci, že na základě této studie látka K1277 poskytuje velmi zajímavé metabolity a její další aplikace například v *in vivo* experimentech může být spojena s různými biologickými efekty, ačkoli není zatím jasné, zda se bude jednat o efekty příznivé či nikoliv. V rámci této diplomové práce se tak podařilo naplnit všechny vytyčené cíle uvedené v kapitole Cíl práce a výsledky budou využity k plánování dalších experimentů *in vivo*.

9. LITERATURA

Ahuja S., Rasmussen H. HPLC method development for pharmaceuticals. London: Elsevier academic press, 2007: 533.

Alzheimer A. Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und phychish-Gerichtliche Medizin, (Berlin) 1907; 64; 146-148.

Anonym. Procedures for screening chemicals for carcinogenicity. British journal of industrial medicine 1980; 37; 1-10.

Asha S, Vidyavathi M. Role of human liver microsomes in *In vitro* metabolism of drugs – a review. Applied biochemistry and biotechnology 2010; 160; 1699-1722.

Bar R, Boehm-Cagan A, Luz I, Kleper-Wall Y, Michaelson DM. The effects of apolipoprotein E genotype, a-synuclein deficiency, and sex on brain synaptic and Alzheimer's disease-related pathology. Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring 2018; 10; 1-11.

Bártíková H. et al. The activity of drug-metabolizing enzymes and the biotransformation of selected anthelmintics in the model tapeworm *Hymenolepis diminuta*. Parasitology 2012; 138; 809-818.

Belcher J. et al. Structure and Biochemical Properties of the Alkene Producing Cytochrome P450 OleTJE (CYP152L1) from the *Jeotgalicoccus* sp 8456 Bacterium. Journal of biological chemistry; 2014; 289; 10.

Burns A. The Effects of Donepezil in Alzheimer's Disease – Results from a Multinational Trial. Dementia and geriatric cognitive disorders, 1999; 10; 237-244.

Brandon EFA, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JHM. An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. Toxicology and Applied Pharmacology 2003; 189; 233–246.

Brandon EFA. *In vitro* characterization of the human biotransformation of marine derived anti-cancer drugs. Disertation. Utrecht University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Utrecht, 2004: 166.

Brunton et al., Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw Hill Professional 11. Vydání; 2005; 1984.

Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN, Horning MG, and Horning EC. Subprogram Detection System for Gas Phase Analysis Based upon Atmospheric Pressure Ionization (API) Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 1974; 46; 706-710.

Castro-Perez JM. Current and future trends in application of HPLC - MS to metabolite-identification studies. *Drug discovery today* 2007; 12; 250-256.

Cavalli et al. Multi-targeted-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *Journal of medicinal chemistry* 2008; 51.

Clementi F, Fumagalli G. General nad molecular pharmacology, principles of drug action. 4th edition. Hoboken: John Wiley and Sons, 2012; 786.

Colin-Gonzalez AL, Maldonado PD, Santamaria A. 3-Hydroxykynurenine: an intriguing molecule exerting dual actions in the central nervous system. *Neurotoxicology* 2012; 34; 189-204.

David KL and Powchick P. Tacrine. *The Lancet* 1995; 345; 625-630.

Doležal M. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém.. 1. Vyd. Praha: Karolinum, 2013; 188.

Dorp EL, Morariu A, Dahan A. Morphine-6-glucuronide: potency and safety compared with morphine. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2008;9;1955-1961.

Drew L. An age-old story of dementia. The biology and epidemiology of Alzheimer's disease. *Nature* 2018; 559; 2-3.

Edlund PO, Baranczewski P. Identification of BVT.2938 metabolites by LC/MS and LC/MS/MS after *in vitro* incubations with liver microsomes and hepatocytes. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 2004; 34; 1079-1090.

Eklund BI, Gunnarsdottir S, Elfarra AA, Mannervik B. Human glutathione transferases catalyzing the bioactivation of anticancer thiopurine prodrugs. *Biochemical pharmacology* 2007; 73; 1829-1841.

Eswaramoorthy S., Bonanno JB, Burley SK, Swaminathan S. Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103; 9832-9837.

Eto M., Casida JE., Eto T. Hydroxylation and cyclisation reactions involved in the metabolism of tri-o-cresyl phosphate. *Biochemical Pharmacology* 1962; 11; 337-352.

Farlow M, Gracon SI, Hershey LA, Lewis KW, Sadowsky CH, Dolan-Ureno J. A controlled trial of tacrine in alzheimer's disease. *Journal of the American Medical Association* 1992; 268; 2523-2529.

Felician O., Sandson T. The neurobiology and pharmacotherapy of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*.1999;11;19-31.

Fisher RL, Gandolfi AJ, Brendel K.. Human liver quality is a dominant factor in the outcome of *in vitro* studies. *Cell Biology and Toxicology* 2001; 17; 179–189.

Foti RS, Fisher MB. Impact of incubation conditions on bufuralol human clearance predictions: enzyme lability and nonspecific binding. *Drug metabolism and disposition* 2004; 32; 295-304.

Gibson G. and Skett P. Pharmacological and toxicological aspects of drug metabolism. In: *Introduction to Drug Metabolism*. Springer US: 1994: 266.

Gross JH. *Mass spektrometry*. Springer Berlin Heidelberg: 2011: 753.

Heyes MP, Saito K, Major EO, Milstien S, Markey SP, Vickers JH. A mechanism of quinolinic acid formation by brain in inflammatory neurological disease. Attenuation of synthesis from L-tryptophan by 6-chlorotryptophan and 4-chloro-3-hydroxyanthranilate. *Brain* 1993; 116; 1425-1450.

Heyes MP, Chen CY, Major EO, Saito K. Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *Biochemical Journal* 1997; 326; 351-356.

Holčapek M, Kolářová L., Nobilis M. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2008; 391; 59-78.

Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *The Journal of Cell Biology* 1967; 35; 675–684.

Hroch M, Havlínová Z, Nobilis M, Chládek J. HPLC determination of arginases inhibitor N-(α)-hydroxy-nor-l-arginine using core–shell particle column and LC–MS/MS identification of principal metabolite in rat plasma. *Journal of chromatography B* 2012; 880; 90-99.

Hutzler JM, Ring BJ, Anderson SR. Low-Turnover Drug Molecules: A Current Challenge for Drug Metabolism Scientists. *Drug metabolism and disposition* 2015; 43; 1917-1928.

Jia L. a Liu X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *In vitro* experiments. *Current drug metabolism* 2007; 8; 822-829.

Jiráček R. Diagnostika a terapie Alzheimerovy choroby. *Neurol. pro praxi*, 2008; 9(4); 240–244.

Jiráček R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. *Remedia* 2009; 5; 342-345.

Jiráček R. Stará a nová diagnostická kritéria pro Alzheimerovu chorobu v podmínkách ČR *Neurol. pro praxi*, 2011; 12(2); 135–137.

Jones DT. Tau, amyloid, and cascading network failure across the Alzheimer's disease spectrum. *Cortex* xxx 2017; 1-17 .

Jouanne M, Rault S, Voisin-Chiret AN. Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2017; 139; 153-167.

Koukolík F a Jiráček R. Alzheimerova nemoc a další demence. 1.vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s. r. o. 1998:232.

Krishna DR, Klotz U. Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clinical Pharmacokinetic* 1994; 26: 144.

Kromidas S. The HPLC - MS handbook for practitioners. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany; 2017: 233.

Kruk et al. NMR Techniques in Metabolomic Studies: A quick overview on examples of utilization. *Applied magnetic resonance* 2017; 48; 1-21.

Kumar et al. Targeted analysis with benchtop quadrupole–orbitrap hybrid mass spectrometer: Application to determination of synthetic hormones in animal urine. *Analytica chimica Acta* 2013; 780; 65-73.

Lee BM, Kacew S. Lu's basic toxicology: Fundamentals, target organs and risk assessment. Washington, DC: Taylor & Francis, 1996: 416.

Lee MS, Zhu M. Mass spektrometry in drug metabolism and disposition: Basic principles and application. New York, John Wiley & Sons 2011: 800.

Lee YS, Chow WNV & Lau KF. Phosphorylation of FE65 at threonine 579 by GSK3 β stimulates amyloid precursor protein processing. *Scientific reports* 2017; 7; 1-10.

Levsen K, Schiebel HM, Behnke B, Dotzer R, Dreher W, Elend M, Thiele H. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *Journal of chromatography A* 2007; 1067; 55-72.

Link M. Metabolická studie sibutraminu. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta: 2007; 120.

Mačák J, Mačáková J, Dvořáčková J. *Patologie*. 2. doplněné vyd. Praha: Grada-Publishing, a.s., 2012; 352.

Matouš et al. *Zákady lékařské chemie a biochemie*. 1. Vydání. Nakladatelství Galén; 2010: 540.

Mehta M, Adem A, Sabbagh M. New Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's disease* 2012; 8.

Molino I, Colucci L, Fasanaro AM, Traini E, Amenta F. Efficacy of Memantine, Donepezil, or their Association in Moderate-Severe Alzheimer's Disease: A review of clinical trials. *The Scientific World Journal* 2013; 8.

Musilová J, Glatz Z. *Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie*. *Chemické listy* 2011; 105; 745-751.

Nepovimová et al. Tacrine – Trolox hybrids: A novel class of centrally active, nonhepatotoxic multi-target-directed ligands exerting anticholinesterase and antioxidant activities with low *in vivo* toxicity. *Journal of medicinal chemistry* 2015; 58; 8985-9003.

Nováková L., Douša M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Europrint, 2013; 299.

Nováková L, Douša M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. Vyd. Praha: Europrint a.s. 2013; 235.

Palego L, Betti L, Rossi A, Giannaccini G. Tryptophan biochemistry: Structural, nutritional, metabolic and medical aspects in humans. *Journal of amino acids* 2016; 13.

Parrish AR., Gandolfi AJ, Brendel K. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life sciences* 1995; 57; 1887-1901.

Patočka J., Jun D., Kuča K. Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of alzheimer's disease. *Current drug metabolism* 2008; 9(4); 332-335.

Plant et al. Strategies for using *in vitro* screens in drug metabolism. *Drug discovery today*. 2004; 9; 328-336.

Puviania AC, Ottolenghi C, Tassinari B, Pazzi ., Morsiani E. An update on high-yield isolation methods and on the potential clinical use of isolated liver cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 1998; 121; 99–109.

Ramachandran A., Jaeschke H. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. *Journal of clinical and translational research*, 2017; 1; 157.

Reitz Ch., Mayeux R. Alzheimer disease: Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers. *Biochemical pharmacology* 2014; 88; 640-651.

Romero A., Cacabelos R, Oset-Gasque MJ, Samadi A., Marco-Contelles J. Novel tacrine-related drugs as potential candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2013; 23; 1916-1922.

Scigelova M., Makarow A. Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. *Practical proteomics* 2006; 1-2; 16-21.

Shu YZ, Johnson BM, Yang TJ. Role of biotransformation studies in minimizing metabolism-related liabilities in drug discovery. *Journal of the American association of Pharmaceutical scientists* 2008; 10; 178-192.

Schellinger AP, Carr PW. Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *Journal of chromatography A* 2006; 1109; 253-266.

Silbernagl S a Lang F. Atlas patofyziologie. 2. Vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004: 406.

Spilovska et al. Multitarget tacrine hybrids with neuroprotective properties to confront Alzheimer's disease. *Current topics in medicinal chemistry* 2017; 17; 21.

Strítěský J. Patologie. 1. vyd.. Olomouc: Epava, 2001: 338.

Suelter C. H., Methods of biochemical analysis – biomedical applications of mass spektrometry. 1st edition, John Wiley and Sons, New York, 1990: 385.

Szultka-Mlynska M. a Buszewski B. Study of in-vitro metabolism of selected antibiotic drugs in human liver microsomes by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2016; 408; 8273-8287.

Tang et al. Effect of Age, Ethnicity, and Head Injury on the Association between APOE Genotypes and Alzheimer's Disease. *Annals New York Academy of sciences* 1996; 802; 6-15.

Tetsuka K., Ohbuchi M., Tabata M. Recent Progress in Hepatocyte Culture Models and Their Application to the Assessment of Drug Metabolism, Transport, and Toxicity in Drug Discovery: The Value of Tissue Engineering for the Successful Development of a Microphysiological System. *Journal of pharmaceutical sciences* 2017; 106; 2302-2311.

Toledo JB. Metabolic network failures in Alzheimer's disease: A biochemical road map. *Alzheimer's & Dementia* 2017; 13; 965-984.

Vlček J a Fialová D. *Klinická farmacie I. 1. Vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2010: 368.*

Vykoukalová Nikol. Predikce průchodu takrin-bqca derivátů přes hematoencefalickou bariéru. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2017: 72.

Walker LC., Rosen RF. Alzheimer therapeutics – what after the cholinesterase inhibitors? *Age and Ageing*. 2006;35;332-335.

Wang R., Yan H., Tang X. Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine. *Acta pharmacologica sinica*. 2006; 27; 1-26.

Winblad et al. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet Neurology* 2016; 15; 455-532.

Xu Y, Wang Q, Yin Z, Gao X. On-line incubation and real-time detection by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapidly analyzing metabolites of anthraquinones in rat liver microsomes. *Journal of chromatography A* 2018; 1-38.

Yang TJ, Shou M, Korzekwa KR, Gonzales FJ, Gelboin HV, Yang SK. Role of cDNA-Expressed Human Cytochromes P450 in metabolism of diazepam. *Biochemical pharmacology* 1998; 55; 889-896.

Zhang LS and Davies SS. Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions. *Genome medicine* 2016; 8; 1-18.

Zhang M, Robertus JD. Molecular cloning and characterization of full-length flavin-dependent monooxygenase from yeast. *Archives of biochemistry and biophysics* 2002;403; 277-283.

Elektronické zdroje:

Biologická dostupnost takrinu po per orálním podání. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1935, 2005 [online]; Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tacrine#section=ATC-Code> [cit. 10.7.2018]

Tryptophan ; New world encyclopedia [online]; Dostupné na URL: http://www.newworldencyclopedia.org/entry/File:Tryptophan_metabolism.png#filelinks [cit. 5.4.2018]

Schéma HPLC; Wikipedia [online]; Dostupné na URL: https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/File:Preparative_HPLC.svg [cit. 3.3.2018]

Popis chromatogramu; www.community.asdlib.org [online]; Dostupné na URL: <http://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/2013/08/01/retention-time-baseline-width-and-void-time/> [cit. 3.3.2018]

Schéma hmotnostního spektrometru; www.dgms.eu [online]; Dostupné na URL: <https://dgms.eu/en/about-dgms/this-is-mass-spectrometry/mass-spectrometers/> [cit. 3.3.2018]

Preference ionizačních technik; www.shimadzu.eu.com [online]; Dostupné na URL: <https://www.shimadzu.eu.com/ionization-options-appi-apci> [cit. 3.3.2018]

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Přehled metabolických experimentů,.....	51
Tab. 2: Parametry nastavení HPLC metody.....	52
Tab. 3: Parametry nastavení MS.....	53
Tab. 4: Přehled metabolitů s uvedením jejich chromatografických charakteristik.....	61
Tab. 5: Tabulka hodnot koncentrací před a po inkubaci látky K1277 s HLM.....	83

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Umístění cytochromů v membráně endoplazmatického retikula a struktura hemu.....	16
Obr. 2: Katalytický cyklus cytochromu P450.....	17
Obr. 3: Katalytický cyklus FMO.....	18
Obr. 4: Patofyziologické znaky AD u pacientů s AD.....	26
Obr. 5: Rozdíly v makroskopické stavbě mozku u zdravých lidí a pacientů s AD.....	27
Obr. 6: Chemická struktura donepezilu.....	30
Obr. 7: Chemická struktura rivastigminu.....	30
Obr. 8: Chemická struktura galantaminu.....	30
Obr. 9: Chemická struktura memantinu.....	31
Obr. 10: Schéma metabolismu takrinu.....	33
Obr. 11: Základní metabolické dráhy L-tryptofanu.....	35
Obr. 12: Schéma kapalinového chromatografu.....	38
Obr. 13: Popis chromatogramu.....	39
Obr. 14: Schéma instrumentace hmotnostního spektrometru.....	40
Obr. 15: Schéma znázorňující preference jednotlivých ionizačních technik.....	41
Obr. 16: Vzorec látky K1277.....	49
Obr. 17: Eluční gradientový program, který byl použit během LC-MS/MS analýz.....	52
Obr. 18: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) parentní látky K1277.....	56
Obr. 19: Charakteristická izotopová obálka parentní látky K1277($[M+2H]^{2+}$).....	57
Obr. 20: Fragmentační spektrum parentní látky K1277 s vyznačenými nejintenzivnějšími fragmenty... ..	57
Obr. 21: Mapa struktur hypotetických fragmentů parentní látky K1277 odvozených od 6-chlortakrinu ..	58
Obr. 22: Přehled hypotetických struktur fragmentů látky K1277 odvozených od struktury tryptofanu... ..	59
Obr. 23: Přeložené Extrahované Iontové Chromatogramy (XIC) parentní látky a jejích metabolitů.....	60
Obr. 24: Přeložené TIC chromatogramy metabolisovaného vzorku K1277 a vzorku obsahující pouze médium a samotné HLM.....	61
Obr. 25: Přehled hypotetických struktur metabolitů látky K1277.....	62
Obr. 26: XIC nejintenzivnějšího metabolitu M1.....	63
Obr. 27: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M1 zjištěna experimentálně.....	64
Obr. 28: Fragmentační spektrum metabolitu M1 s vyznačenými nejintenzivnějšími ionty.....	64
Obr. 29: Přehled hypotetických struktur fragmentů metabolitu 1 odvozených od struktury chlortakrinu ..	65
Obr. 30: Přehled hypotetických struktur fragmentů metabolitu 1 odvozených od tryptofanu.	66

Obr. 31: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) metabolitu M2.....	67
Obr. 32: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M2 stanovena experimentálně.....	68
Obr. 33: Fragmentační spektrum metabolitu M2 s vyznačenými nejintenzivnějšími fragmenty.....	68
Obr. 34: Přehled hypotetických struktur fragmentů metabolitu M2.....	69
Obr. 35: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) metabolitu M3.....	70
Obr. 36: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M3,.....	71
Obr. 37: Graf znázorňující všechny fragmenty vzniklé fragmentací metabolitu M3.....	71
Obr. 38: Znázornění hypotetických struktur fragmentů metabolitu M3 odvozených od tryptofanu.....	71
Obr. 39: Záznam hypotetických struktur fragmentů metabolitu 3 od chlortakrinové části a jejich m/z...	73
Obr. 40: Extrahovaný iontový chromatogram (XIC) metabolitu 4	74
Obr. 41: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M4.....	75
Obr. 42: Fragmentační spektrum metabolitu M4 se zvýrazněnými hlavními fragmenty.....	75
Obr. 43: Přehled hypotetických struktur fragmentů metabolitu M4 odvozených od tryptofanu.....	76
Obr. 44: Hypotetické struktury fragmentů metabolitu M4.....	77
Obr. 45: XIC metabolitu M5.....	78
Obr. 46: Charakteristická izotopová obálka metabolitu M5 stanovena experimentálně.....	79
Obr. 47: Fragmentační spektrum metabolitu M5 s nejintenzivnějšími fragmenty a uvedením jejich m/z	79
Obr. 48: Znázornění fragmentů metabolitu M5 s vyznačením jejich poměru hmoty a náboje.....	80
Obr. 49: Znázornění fragmentů metabolitu M5 s vyznačením jejich poměru hmoty a náboje.....	81
Obr. 50: Kalibrační přímka závislosti koncentrace parentní látky K1277 na ploše pod píkem.....	82
Obr. 51: Koncentrace látky K1277 ve vzorku před a po biotransformaci v dvou různých médiích.....	83