

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**Bioanalytické hodnocení nových inhibitorů acetylcholinesteráz**  
(soubor publikovaných prací doplněných komentářem)

**Martin Mžik**

**Autoreferát disertační práce**  
**Doktorský studijní program: Klinická biochemie**

**Hradec Králové**  
**2019**

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Klinická biochemie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty v Hradci Králové.

- Autor: Mgr. Martin Mžik  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky  
LF HK a FN HK, Univerzita Karlova
- Školitel: prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., dr. h. c.  
Ústav klinické biochemie a diagnostiky  
LF HK a FN HK, Univerzita Karlova
- Školitel  
konzultant: pplk. doc. PharmDr. Jana Žďárová Karasová, Ph.D.  
Katedra toxikologie a vojenské farmacie  
Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany
- Oponenti: doc. RNDr. Vítězslav Maier, Ph.D.  
Ústav soudního lékařství a medicínského práva  
Fakultní nemocnice Olomouc
- doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Klinická biochemie dne 17.9.2019 na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, posluchárna č. B401, 4. patro, areál Fakultní nemocnice Hradec Králové, od 15:30 hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906), SVV-260398 a SVV-260181, PRVOUK P37/11 a Progress Q40/01.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., Dr.h.c  
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací  
v doktorském studijním programu Klinická biochemie  
Garant studijního programu

## OBSAH

---

<b>1</b>	<b>SOUHRN .....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>ÚVOD DO PROBLEMATIKY .....</b>	<b>4</b>
3.1	Alzheimerova demence .....	4
3.1.1	Epidemiologie a neuropatologie.....	4
3.1.2	Cholinesterázy.....	5
3.1.3	Současná terapie a nové strategie léčby AD.....	5
3.2	bioanalýza léčiv .....	7
3.2.1	Úprava biologických vzorků před analýzou .....	8
3.2.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	8
3.2.3	Hmotnostní spektrometrie .....	9
3.2.4	Validace bioanalytické metody.....	11
3.3	Farmakokinetika a metabolismus .....	12
<b>4</b>	<b>CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE – KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACÍM.....</b>	<b>14</b>
5.1	Analytická metoda pro stanovení PC-37 a PC-48 v plazmě, hodnocení farmakokinetického profilu a metabolizace .....	14
5.2	Analytická metoda pro stanovení donepezilu a jeho tří fragmentů v plazmě a mozku, hodnocení farmakokinetického profilu .....	17
5.3	Analytická metoda pro stanovení S-K1025 a S-K1026 v plazmě a mozku potkanů, hodnocení farmakokinetického profilu a metabolizace .....	21
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>27</b>
<b>8</b>	<b>PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI .....</b>	<b>32</b>
8.1	Seznam publikací zahrnutých v disertační práci .....	32
8.2	Seznam publikací nezahrnutých v disertační práci .....	33
8.3	Plakátová sdělení na odborných setkáních.....	33

# 1 SOUHRN

Bioanalytické hodnocení je základním pilířem preklinického výzkumu nových léčiv, které zahrnuje zkoumání jejich farmakokinetiky a metabolismu. Využití moderních analytických přístupů je v této oblasti téměř nezbytné, proto se v současnosti uplatňují techniky založené především na chromatografii a hmotnostní spektrometrii. Validace analytických metod dle aktuálních doporučení je naprostou nutností pro získání spolehlivých kvantitativních výsledků, na jejichž základě lze nové léčivo hodnotit.

Předložená disertační práce se v teoretické části zabývá úvodem do problematiky Alzheimerovy demence a stručně popisuje nové strategie léčby. V dalších kapitolách je věnována pozornost tématům, které se bezprostředně týkají experimentální práce – kapalinové chromatografii, hmotnostní spektrometrii, úpravě biologických vzorků, validaci metod a farmakokinetice. Experimentální část je koncipována jako soubor pěti publikovaných článků s komentářem, které jsou tematicky rozděleny do tří kapitol: **I.** bioanalytické hodnocení látek PC-37 a PC-48 – nových duálních inhibitorů cholinesteráz odvozených od 7-methoxytakrinu a donepezilu, **II.** studium vlivu struktury donepezilu a jeho strukturálních částí na transport přes hematoencefalickou bariéru, **III.** bioanalytické hodnocení látek S-K1025 a S-K1026 – nových duálních inhibitorů cholinesteráz odvozených od 7-methoxytakrinu a tryptofanu.

V experimentální práci je komentován vývoj a validace analytických metod pro hodnocení farmakokinetiky a metabolismu nových léčiv. Jsou diskutovány problémy se kterými se bylo nutné vypořádat při zavádění kvantitativních a screeningových metod. Na základě stanovených farmakokinetických parametrů a výsledků z metabolického profilování jsou jednotlivé kandidátní látky diskutovány především z pohledu přestupu do cílového orgánu – mozku. PC-37 i PC-48 díky zabudované substituované benzylpiperazinové skupině jsou schopné aktivního transportu do mozku, kde se i akumulují – koncentrace v mozku převyšuje plazmatickou dvojnásobně. Naopak S-K1025 i S-K1026 především z důvodu metabolické nestability, s přispěním fyzikálně-chemických vlastností, nejsou schopné dostávat se do mozku ani ve stopovém množství. Výsledky této disertační práce poskytují informace, které mohou přispět k racionálnímu vývoji nových účinnějších léčiv proti Alzheimerově demenci, nebo léčiv s vhodnějším farmakokinetickým profilem.

## 2 SUMMARY

Bioanalytical evaluation plays a pivotal role in preclinical research of new drugs, particularly in investigation of their pharmacokinetics and metabolism. Use of modern analytical approaches is indispensable; chromatography and mass spectrometry are the techniques of choice in this area of research. To obtain reliable data, the analytical methods must be validated. Several authorities – such as European Medicines Agency or Food and Drug Administration – have published recommendations on bioanalytical method validation.

In its theoretical part, this dissertation deals with description of Alzheimer's dementia with special focus on treatment strategies. Further attention is paid to topics that are directly related to the experimental work - liquid chromatography, mass spectrometry, sample preparation, method validation and pharmacokinetics. The experimental part – a commentary on the author's published articles – consists of three units: **I.** bioanalytical evaluation of PC-37 and PC-48 – novel 7-methoxytacrine and donepezil-derived dual cholinesterase inhibitors, **II.** study of the transport of donepezil across the blood-brain barrier with focus on its structure and substructures and **III.** bioanalytical evaluation of S-K1025 and S-K1026 - new 7-methoxytacrine and tryptophan-derived dual cholinesterase inhibitors.

In all three units, the author discusses development and validation of analytical methods, pharmacokinetics and/or metabolism of the studied substances and their transfer to the target organ – the brain. Both PC-37 and PC-48, thanks to the incorporated substituted benzylpiperazine group, are capable of active transport to the brain where they accumulate - the brain concentration exceeded that of plasma. In contrast, both S-K1025 and S-K1026 failed to reach the brain even in trace amounts mainly due to their metabolic instability and non-optimal physicochemical properties. The results discussed in this dissertation provide new information that can contribute to rational development of new, more effective drugs to battle Alzheimer's dementia or drugs with a more convenient pharmacokinetic profile.

## 3 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

### 3.1 ALZHEIMEROVA DEMENCE

#### 3.1.1 Epidemiologie a neuropatologie

AD je neurodegenerativní onemocnění mozku, které vede k progresivní ztrátě kognitivních funkcí – myšlení, paměti, úsudku. AD začíná pozvolna a končí smrtí pacienta. Nejdříve dochází ke zhoršení krátkodobé paměti, později se objevují problémy s vyjadřováním, rozhodováním a zmatenost. Doba přežití je v průměru 5-8 let od diagnózy (*Ganguli, M. et al, 2005*).

Alzheimerova choroba je s prevalencí 1 % populace nejčastější ze všech demencí a čtvrtou až pátou nejčastější příčinou úmrtí (*Ganguli, M. et al, 2005*). Incidence AD stoupá exponenciálně s věkem, mezi 65 a 74 lety je 3 %, mezi 75 a 84 lety je již 19 % a po 85. roce věku dosahuje 47 % (*Alzheimers Association, 2015*). Ve světě trpí určitým typem demence více než 50 milionu lidí, z toho více než polovina (60 %) žije v nízké a středně-příjmových zemích. Celosvětově přibývá 7,7 milionu nově diagnostikovaných případů ročně, tj. jeden za čtyři sekundy. Studie WHO z konce roku 2017 (*WHO, 2017*) předpokládá, že celkový počet nemocných s AD bude v roce 2030 okolo 82 milionů. Jen v Evropě dojde ke nárůstu ze současných 10 na 19 milionů.

Diagnostika AD se opírá o nejnovější diagnostické metody (CT, MRI, PET) a laboratorní analýzy (analýza mozkomíšního moku), která diagnostiku AD posunují už do časných stádií nemoci.

Alzheimerova demence je komplexní onemocnění s multifaktoriální etiologií, jejíž přesná patogeneze není prozatím zcela objasněna. AD je charakterizována ztrátou neuronů a synapsí v mozkové kůře a určitých subkortikálních oblastech, které vedou k atrofii těchto oblastí. Postiženy jsou i neurony v temporálním a parietálním laloku, a v části frontální kůry mozkové, což se také projevuje zmenšením těchto částí mozku (*Braak, H. et al, 1991*). V současnosti je uznáváno několik základních hypotéz, které vedou k výše jmenovaným dějům. Jedná se především o:

- I. **Amyloidní hypotézu** – tvorba a akumulace A $\beta$  peptidů v extracelulárním prostoru vede k jejich oligomerizaci s následnou tvorbou senilních plaků. Ty jsou zodpovědné za snížení synaptické aktivity a rozvoj prozánětlivých procesů, jež způsobují oxidativní poškození neuronů. Poškozené neurony mají narušenou aktivitu proteinkináz a fosfatáz, která ve výsledku vede k hyperfosforylaci tau proteinu a tvorbě neurofibrilárních klubek (*Castro, A. et al, 2006*).
- II. **Tau hypotézu** – hyperfosforylace tau proteinů zabraňuje vykonávat jejich fyziologickou funkci (stabilizaci mikrotubulů) a usnadňuje jejich agregaci za vzniku neurofibrilárních klubek (*Johnson, G.V. et al, 2004*).
- III. **Cholinerní hypotéza** – je založena na předpokladu, že ztráta cholinerní aktivity (selektivní zánik acetylcholinerních neuronů) u AD pacientů je v úzkém vztahu mezi neuromediátorem ACh a schopností učení a paměti (*Cummings, J.L. et al, 2004*).

Vedle těchto hypotéz se významně uplatňují i další mechanismy patogeneze AD jako je zánětlivá reakce, oxidativní stres, poškození mitochondriálního metabolismu, nebo snížená tvorba nervových růstových faktorů (*Andersen, J.K. et al, 2004*). Řada těchto mechanismů je úzce propojena. Např. v oblasti plaků vzniká sterilní zánět s aktivací mikroglálních buněk i astrocytů. V rámci imunitní reakce akutní fáze dochází k uvolnění cytokinů a volných kyslíkových radikálů, které poškozují lipidy buněčné membrány neuronů. Takto postižené neurony následně zanikají,

dochází k uvolnění nadměrného množství excitačních aminokyselin (glutamát, aspartát), které se v CNS váží na příslušné receptory. Nadměrná stimulace tzv. ionotropních receptorů (např. NMDA: N-methyl-D-aspartátový receptor), spojených s otevřením kalciového kanálu, vede k nadměrnému influxu  $Ca^{2+}$  iontů do neuronů. Tím dochází k destabilizaci vnitřního prostředí, aktivaci proteinkináz, a v konečném důsledku k buněčné smrti. NMDA-receptory realizují jeden ze základních dějů učení – dlouhodobou potenciaci (zesílení synaptického přenosu mezi dvěma neurony jako výsledek jejich současné stimulace), tento mechanismus je hyperexcitací NMDA-receptorů narušen. (*Scarpini, E. et al, 2003; Andersen, J.K. et al, 2004*)

### 3.1.2 Cholinesterázy

Cholinesterázy (ChE) jsou skupinou enzymů, které katalyzují hydrolýzu ACh na cholin a octovou kyselinu. Na základě svých katalytických vlastností se dělí na dva typy: I. Acetylcholinesteráza (AChE, EC 3.1.1.7) – enzym, který primárně hydrolyzuje malou molekulu ACh, a II. Butyrylcholinesteráza (BChE, EC 3.1.1.8), která je schopná štěpit navíc i větší molekuly substrátu jako je butyrylcholin nebo benzoylcholin (*Darvesh, S. et al, 2003*).

Krystalografické analýzy AChE izolované z *Torpedo californica*, a později lidské rekombinantní AChE, umožnily přesný popis struktury tohoto enzymu – AChE je konformačně neplastický enzym sestávající ze třech hlavních částí (*Dvir, H. et al, 2010*):

- I. **Katalytické aktivní místo (CAS)** – nachází se hluboko uvnitř enzymu a je zodpovědné za vazbu molekuly ACh, její správnou orientaci a hydrolýzu
- II. **Periferní aniontové místo (PAS)** – umístěné na povrchu enzymu je zodpovědné za vazbu alosterických ligandů (především inhibitorů)
- III. **Aromatické hrdlo** – dlouhá rovná trychtýřová dutina, která propojuje CAS a PAS. Umožňuje průnik ACh do katalytického aktivního místa.

I když je primární funkcí AChE i BChE enzymatická hydrolýza cholinových substrátů, v nedávné době byly popsány nové nekatalytické, tedy necholinergní role. Obě cholinesterázy se uplatňují v procesu morfogenního vývoje mozku a jeho diferenciaci, a co je z hlediska pochopení progresu AD nejdůležitější, hrají významnou roli v tvorbě A $\beta$  plaků (*Pope, C.N. et al, 2018*). Cholinesterázy se konzistentně ukládají v amyloidních placích a prostřednictvím protein-proteinové interakce s A $\beta$  akcelerují jejich ukládání a agregaci – fungují jako nukleační faktor, který usnadňuje a urychluje konverzi solubilních A $\beta$  peptidů v nesolubilní amyloidní fibrily tím, že je konformačně pozmění (*Diamant, S. et al, 2006*). Krystalografické analýzy odhalily, že za interakci enzymu s A $\beta$  peptidy je zodpovědné periferní aniontové místo (PAS). Tato skutečnost vedla k syntéze nových potenciálních léčiv, které se označují jako **inhibitory s dvojitým vazebným místem (duální inhibitory)** – jsou schopné inhibovat degradaci acetylcholinu tím, že se váží na CAS a zároveň vazbou na PAS redukovat interakci s A $\beta$  peptidy.

### 3.1.3 Současná terapie a nové strategie léčby AD

V současné době jsou v klinické praxi pouze dvě skupiny léčiv, které vedou ke zpomalení progresu demence a oddálení jejich těžkých stadií. První skupinu reprezentují tzv. kognitiva – centrálně působící inhibitory mozkových acetyl- i butyrylcholin-esteráz. Tato léčiva zlepšují cholinergní transmisí tím, že blokují enzymy odbourávající ACh. V současnosti je k dispozici donepezil, rivastigmin a galantamin. Jejich účinnost byla potvrzena mnoha randomizovanými, placebem kontrolovanými klinickými studiemi (*Rösler, M. et al, 1999; Rogers, S.L. et al, 1996; Tariot, P.N. et al, 2000*). Na inhibitory mozkových cholinesteráz reaguje příznivě asi 70 %

pacientů. Při neúčinnosti jednoho inhibitoru ChE se přechází na druhý, nejdříve ale až po půl roce nepřetržitého podávání. Druhou skupinu reprezentuje pouze jeden zástupce – memantin, který má zcela odlišný mechanismus účinku. Je nekompetitivním antagonistou glutamátových N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů. Blokuje jejich chronickou hyperaktivaci, a tím redukuje influx  $Ca^{2+}$  iontů do buňky, jehož nadměrné množství indukuje apoptózu. Memantin je efektivní v léčbě středně těžké až těžké AD, a to jak v monoterapii (**Reisberg, B. et al, 2003**), tak v kombinaci s donepezilem (**Tariot, P.N. et al, 2004**). Léčba memantinem vede ke zlepšení kognitivních funkcí, celkové výkonosti, psychických symptomů a poruch chování.

Ačkoliv cholinergní hypotéza byla velkým přínosem a definovala základy dnes dostupné paliativní léčby AD, v současnosti je na ní pohlíženo s určitým skepticizmem – podávání inhibitorů AChE nevede k uzdravení ani k zastavení progresu této nemoci. Protože cholinergní hypotéza nedokázala vysvětlit základní příčinu vzniku AD, pozornost se začala ubírat směrem i k dalším doposud popsaným procesům ovlivňující patogenezi. V současnosti jsou proto vyvíjeny nové preparáty (na bázi malých molekul, peptidů nebo protilátek), které na základě farmakodynamických cílů je lze rozčlenit do tří základních terapeutických přístupů (**Atta-Ur-Rahman, et al, 2015**):

- I. **Anti-amyloidní terapie** – je primárně zaměřena na snížení produkce  $A\beta$  prostřednictvím inhibice sekretáz, zvýšením clearance  $A\beta$ , nebo blokováním  $A\beta$  agregace. Ve třetí fázi klinického testování je celkem 9 preparátů (**Cummings, J. et al, 2018**).
- II. **Tau protein terapie** – vyvíjeny jsou jak inhibitory kináz zodpovědné za hyperfosforylaci tau proteinu, tak preparáty inhibující tau agregaci a/nebo podporující rozložení vzniklých agregátů. V současnosti je ve třetí fázi klinického hodnocení pouze jediný zástupce z této skupiny (**Cummings, J. et al, 2018**).
- III. **Terapie zaměřená na faktory souvisejícími s neurálními plaky a uzlíky** – do této skupiny lze zařadit látky, které přímo nespádají do předcházejících dvou skupin, ale jedná se o farmakologicky velice zajímavé cíle (neuroprotektiva, antioxidanty, statiny, monoaminoxidázy a další). Tyto látky jsou využívány především v symptomatologické léčbě AD, ve třetí fázi klinického hodnocení se z této kategorie nachází 10 preparátů (**Cummings, J. et al, 2018**).

I když se na těchto terapeutických strategiích, včetně cholinergní, pracuje několik desetiletí, od roku 2003 kdy byl registrován memantin, nebyla do klinické praxe uvedena žádná nová léčivá látka. Mezi lety 1998 a 2017 bylo zastaveno klinické hodnocení u 146 preparátů – z toho u 39 % ve 2. nebo 2./3. fázi, a u 18 % ve fázi 3.

Vývoj nových léčiv u tak složitého onemocnění jako je AD je velice náročný. Jedná se o poruchu s komplexní patofyziologií, kterou lze těžko zvládnout ovlivněním jedné biochemické funkce nebo jednoho molekulárního cíle. Tento přístup, který je označován za one-drug-one-target, vedl v minulosti k vývoji celé řady úspěšných léčiv, které jsou používány v řadě onemocnění (**Morphy, R. et al, 2004**). Avšak se selháním tohoto obecně uznávaného schématu u komplexních onemocnění se postupně vyvinuly nové strategie. Od multi-medikační terapie (koktejl dvou a více různých látek kombinujících různé terapeutické mechanismy a způsoby podání), přes multi-komponentní medikaci (dvě a více látek je podáváno společně v jedné formě), až po finální strategii označovanou jako „*multi-target-directed ligands*“ (MTDLs). MTDL je založena na předpokladu, že jediná chemická entita může být schopna zasáhnout několik farmakologických cílů současně (**Cavalli, A. et al, 2008**). MTDL přístup může být naplněn, pokud je známa 3D struktura cílového receptoru. Nová potenciální léčiva jsou navržena přímo na míru



pomocí technik molekulového modelování. Takovýto přístup se označuje jako „na strukturu založený“ nebo také „racionální“ design léčiv.

V současnosti je u AD koncept MTDL široce využíván k designování molekul zaměřených na odlišné farmakologicky významné cíle. Protože inhibitory cholinesteráz jsou stále široce používanými léčivy, je i současným trendem vývoj nových molekul, kde jedna část molekuly je zodpovědná za inhibici cholinesterázy (primárně AChE), a druhá část za jiný farmakodynamický cíl. Pokud bychom chtěli blíže specifikovat současné základní vývojové směry, můžeme farmakodynamickou funkci nových látek zařadit do jedné z těchto skupin:

- I. **Inhibitory AChE (AChEI) s dvojitým vazebným místem (Dual binding site AChEI)** – Inhibice AChE a vazba molekuly na PAS enzymu propojuje cholinergní a amyloidní hypotézu. Současným příkladem AChEI, schopných alespoň částečné inhibice agregace A $\beta$ , je donepezil (snižuje agregaci A $\beta$  o 22 % (**Bartolini, M. et al, 2003**)), galantamin (snížení o 18 %, **Bolognesi, M.L. et al, 2007**) nebo takrin (snížení o 8 %, **Chalupova, K. et al, 2019**). Proto vývoj nových AChEI s dvojitým vazebným místem je v současnosti zaměřen na modifikaci molekuly donepezilu nebo takrinu s cílem dosáhnout lepšího farmakologického profilu s důrazem na zlepšení jejich farmakodynamických vlastností, popřípadě na zvýšení bezpečnosti v dlouhodobém užívání (**Ismaili, L. et al, 2017**).
- II. **Duální AChE a BACE-1 inhibitory** – jsou schopné inhibovat agregaci A $\beta$  dvěma odlišnými mechanismy – vazbou na PAS enzymu AChE, a inhibicí enzymu BACE-1 (inhibice vede ke snížení produkce solubilního A $\beta$ ).
- III. **Duální AChE-MAO inhibitory** – inhibice monoaminoxidázy (enzym produkující reaktivní formy kyslíku během katalytické deaminace neurotransmiterů) redukuje oxidativní zátěž v mozkové tkáni.
- IV. **AChEI a blokátory Ca<sup>2+</sup> kanálků** – přetížení buňky nadměrným množstvím Ca<sup>2+</sup> je jeden z hlavních mechanismů způsobující poškození mitochondrií s následnou aktivací apoptotické kaskády
- V. **AChEI a antioxidanty** – redukce oxidační zátěže je jeden ze slibných terapeutických přístupů.
- VI. **Duální AChE a SERT (transportéry serotoninu) inhibitory** – řada AD pacientů trpí depresí, které se daří zvládat pomocí inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI).

### 3.2 BIOANALÝZA LÉČIV

Výzkum a vývoj nových léčiv má za cíl vyvinout účinná a bezpečná léčiva. Z celkového počtu 5 000 – 10 000 navržených/nasyntetizovaných/*in vitro* testovaných molekul se pouze 250 dostane do preklinického testování, pět do klinického hodnocení, a z pěti bývá zpravidla pouze jedna schválena pro klinickou praxi. Bioanalytické hodnocení nových léčiv zahrnuje zkoumání jejich farmakokinetiky a metabolismu. V minulosti bylo součástí první až druhé fáze klinického hodnocení, nicméně v současnosti se běžně provádí již ve fázi preklinické, nebo ještě dříve. Kandidátní látky s nevhodnými farmakokinetickými parametry nebo metabolismem jsou proto vyřazeny již v počátečních *in vivo* experimentech. Avšak i tato vyřazená léčiva jsou užitečným zdrojem informací – struktury těchto molekul mohou být vylepšeny a opět testovány. Bioanalýza proto hraje klíčovou úlohu v toxikologických, farmakodynamických a farmakokinetických studiích. Poskytuje důležité informace, které umožňují racionalizovat vývoj nových léčiv, ať už z pohledu účinnosti, bezpečnosti, nebo vhodnějších farmakokinetických vlastností.

Vývoj bioanalytických metod je proces, který se řadí mezi „úzká hrdla“ při vývoji nových léčiv. Správná validace metody je velice důležitá pro získání spolehlivých kvantitativních výsledků, na kterých jsou postaveny farmakokinetické výpočty. Analytický proces zahrnuje odběr vzorků, jejich zpracování, analýzu a vyhodnocení, včetně provádění kalibračních a kontrolních měření. Vzhledem ke složitosti biologické matrice (krev, tkáň, žluč atd.) a nízkým koncentracím testovaných látek, může být vývoj bioanalytické metody určitou výzvou (*Moein, M.M. et al, 2017*). Využití moderních analytických přístupů je proto v této oblasti téměř nutností. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (LC-MS) je analytickým zlatým standardem v kvalitativní i kvantitativní analýze léčiv. Chromatografická technika umožňuje separovat cílové analyty od složek matrice, a hmotnostní spektrometr dokáže od sebe oddělit jednotlivé analyty na základě poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Využití hmotnostní spektrometrie nám poskytuje informace o struktuře dané látky, což je spojeno s významným zvýšením selektivity a citlivosti.

Zásadním pokrokem v oblasti bioanalýzy bylo zavedení ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) (*Fekete, S. et al, 2014 A*) a core-shell technologií (*Hayes, R. et al, 2014*), které významně zrychlily a zlepšily účinnost separace látek. Dalším významnou technologií je hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, reprezentována především systémem Orbitrap nebo analyzátoři doby letu (TOF), která i díky vysoké přesnosti měření umožňuje určit pravděpodobné atomární složení molekul, což značně usnadňuje jejich strukturní analýzu. Toho se s výhodou využívá především ve studiu metabolismu zkoumaných látek.

### 3.2.1 Úprava biologických vzorků před analýzou

Jeden z klíčových kroků v kvalitativní i kvantitativní analýze je úprava biologických vzorků před vlastní analýzou. Biologické tekutiny (krev, sérum, plazma, moč) a tkáň jsou velmi komplexní matrice obsahující proteiny, lipidy, soli a další organické a anorganické látky, které mohou během analýzy interferovat s měřeními analyty, nebo poškozovat analytický systém. Z těchto důvodů je nutné před vlastní analýzou vzorky upravovat. Dalším důvodem úpravy je cílené zakoncentrování analytů, které jsou ve vzorku přítomny jen v nízkých koncentracích. Obecně můžeme metody úpravy vzorků rozdělit na konvenční (běžně používané) a moderní, které jsou často odvozené od těch konvenčních. Mezi konvenční metody se řadí proteinová precipitace (PP), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, liquid-liquid extraction) a extrakce na pevné fázi (SPE, solid-phase extraction). Dále zde můžeme zařadit i centrifugaci, filtraci nebo prosté ředění vzorků. (*Meyers, R.A., 2011*)

### 3.2.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je fyzikálně-chemická metoda schopná rozdělit jednotlivé složky ve velice komplexním vzorku. Obecným principem této metody je separace analytů na základě jejich interakce se stacionární a kapalnou fází. Stacionární fází je tuhá látka nebo kapalina, ukotvená na tuhém nosiči, zatímco mobilní fáze je výhradně tvořená kapalinou. Stacionární fáze je umístěná v chromatografických kolonách, kterými protéká mobilní fáze, hnaná v případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie pomocí vysokotlakého čerpadla. Mobilní fáze unáší jednotlivé složky analyzované směsi různou rychlostí, která závisí na interakci mezi oběma fázemi. Existuje celá řada stacionárních a mobilních fází, které lze sestavit do různých variant provedení HPLC. Podle podstaty interakce analytu se stacionární fází pak techniky HPLC můžeme třídit podle tzv. chromatografických modů do několika skupin (*Meyers, R.A., 2011*): chromatografie na

normálních nebo reverzních fázích (nejběžněji zastoupený mód), iontově párová, iontově výměnná, hydrofobní nebo hydrofilní interakční, a vylučovací chromatografie. Každý z těchto módů má svůj účel použití a je v hodnější pro určitý typ látek.

Kapalinový chromatograf je složen z několika základních částí: zásobníků mobilní fáze, degaseru, směšovacího zařízení, chromatografické pumpy, dávkovacího ventilu (součástí autosampleru), kolonového termostatu, analytické kolony a detektoru.

Srdcem chromatografického systému je chromatografická kolona – trubice vyrobena z nerezové oceli nebo semi-krystalického plastového materiálu PEEK (polyetereterketon), která je buď vyplněna částicemi stacionární fáze nebo tvořena jedním kusem sorbentu – monolitem (**Pfaumiller, E.L. et al, 2013**). Existuje celá řada různých typů stacionárních fází lišící se svými fyzikálními a chemickými vlastnostmi, jejichž povrch může být navíc chemicky modifikován. Nejčastěji se využívá modifikace pomocí nepolárních skupin (oktylová, oktadecylová, fenylhexylová, pentafluorofenylová a další), ale povrch silikagelu lze modifikovat i funkčními skupinami na bázi měničů iontů či pro účely chirální separace (**Kazakevich, Y. et al, 2006**). Nejdůležitějším parametrem, který má zásadní vliv na účinnost chromatografické separace je velikost částic, kterými je kolona naplněna (standardně 1,3 – 5,0  $\mu\text{m}$ ). Se zmenšujícím se průměrem částice roste celkový povrch sorbentu a tím se zvyšuje celková účinnost separace. Na druhou snížení velikosti částic vede k markantnímu nárůstu zpětného tlaku na koloně potažmo v celém systému před kolonou (**Gritti, F. et al, 2013**). Plné využití potenciálu sub-2  $\mu\text{m}$  částic umožnila až nová generace chromatografických systémů (UHPLC), které díky specifickým konstrukčním řešením (pumpy, injektor, tubing, šroubení) dokázaly pracovat při tlacích nad 1 000 bar (**Fekete, S. et al, 2014 A**). Jeden ze současných trendů je použití povrchově porézních tzv. **core-shell** (jiné označení fused-core) částic (**Hayes, R. et al, 2014**), které lze využít na HPLC i UHPLC systémech. Klasické částice jsou plně porézní a v celém svém objemu tvořené stejnou strukturou. Naproti tomu core-shell částice jsou tvořené vnitřním pevným neporézním jádrem a vnějším porézním obalem, který na něj těsně přiléhá. Morfologie core-shell částic umožňuje zvýšit účinnost separace a dosáhnout lepšího rozlišení.

K detekci analytů se používá celá řada detektorů pracujících na různých fyzikálních principech. Výstupem je chromatogram, který zobrazuje závislost měřené veličiny na čase. Výběr vhodného detektoru závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech analyzovaných látek. V molekule musí být obsažena funkční skupina, nebo strukturní motiv, který je detekovatelný příslušnou fyzikální technikou. V těchto případech hovoříme o detektorech selektivních. Nebo se k detekci může využít analytická vlastnost systému jako celku, která je v reprodukovatelném vztahu ke koncentraci analytu (index lomu, tepelná vodivost) – jedná se o detektory univerzální (**Swartz, M. et al, 2010**). Mezi běžné detektory využívané v HPLC/UHPLC patří spektrofotometrické (UV-VIS), fluorescenční, „hmotnostní“, elektrochemické, vodivostní, Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) nebo Corona charged Aerosol Detector (CAD), a další.

### 3.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda založena na separaci iontů v plynné fázi na základě jejich poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ). Jedná se o analytickou metodu sloužící k převedení molekul na ionty, separaci těchto iontů na základě  $m/z$  a pomocí vhodné detekce zaznamenání jejich množství, které se vyjadřuje jako relativní intenzita jednotlivých iontů. Hmotnostní spektrometrie poskytuje strukturní informace o daném analytu, a to prostřednictvím fragmentačních spekter, které jsou pro něj vysoce specifické (**Hoffmann, E.D. et**

*al, 2007*). V kombinaci s chromatografickými separačními technikami se hmotnostní spektrometrie stala metodou číslo jedna v analýze složitých biologických vzorků v celé řadě oblastí. Nezastupitelnou úlohu hraje i ve farmaceutickém průmyslu včetně vývoje nových léčiv, nebo v laboratorní medicíně. Základními částmi hmotnostního detektoru je iontový zdroj, iontová optika, hmotnostní analyzátor, detektor iontů, vakuový systém a počítač.

## I. Ionizační zdroj

Ionizační zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na kladně nebo záporně nabitě částice, které následně vstupují přes iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru. Ionizace zpravidla probíhá za atmosférického tlaku, případně některé iontové zdroje vyžadují snížený tlak. Vzhledem k mechanismu převodu látek z neutrálního do iontového stavu rozdělujeme dva typy ionizačních technik (*Kool, J. et al, 2015*). **I. Tvrdé ionizační techniky**, mezi které spadá například elektronová ionizace (EI) nebo méně využívaná chemická ionizace (CI). Tyto techniky se používají výhradně ve spojení s plynovou chromatografií. Označení „tvrdá“ ionizační technika vystihuje proces, kdy molekula získává obrovský přebytek energie, který se následně projevuje rozsáhlou fragmentací molekulárního iontu, a to až do takové míry, že molekulární ion ve spektru může chybět úplně (*Hoffmann, E.D. et al, 2007*). **II. Měkké ionizační techniky**, které umožňují ionizaci molekul bez jejich fragmentace. Ve spojení s kapalinovou chromatografií se v analýze malých molekul nejčastěji využívá ionizace za atmosférického tlaku, kam řadíme ionizaci elektrosprejem (ESI, Electrospray Ionization), chemickou ionizaci (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) a fotoionizaci (APPI, Atmospheric Pressure Photo Ionisation) (*Hoffmann, E.D. et al, 2007; Kazakevich, Y. et al, 2006*). Protože neexistuje univerzální ionizační technika pro všechny látky, které mají zcela odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti, je výběr vhodné ionizační techniky základním předpokladem pro úspěšnou analýzu. Pro ionizační zdroj obecně platí, že by měl pracovat s vysokou efektivitou, a především je vyžadována vysoká stabilita ionizace.

## II. Hmotnostní analyzátor

Hlavní funkcí hmotnostních analyzátorů je dělení jednotlivých iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje  $m/z$ . Principy fungování jednotlivých analyzátorů závisí na působení elektrických nebo magnetických polí na nabitě částice. V bioanalýze se nejčastěji využívají kvadrupólové analyzátor, iontové pasti, analyzátor doby letu, a v posledních letech i orbitální pasti. Využití magnetických sektorů, iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR), nebo analyzátorů iontové mobility je v analýze léčiv okrajové.

Orbitrap je nejnovější typ hmotnostního analyzátoru, který byl na trh uveden v roce 2005 firmou Thermo Electron (dnes Thermo Fisher Scientific). Díky extrémně vysokému rozlišení (až 500 000), vysoké správnosti určení  $m/z$  ( $<1$  ppm) (*Olsen, J.V. et al, 2005*) a cenové dostupnosti se tato technologie právem dostala do většiny moderních bioanalytických laboratoří, kde se využívá jak pro rutinní, tak výzkumné účely. Elektrostatická orbitální past je tvořena centrální elektrodou vřetenovitého tvaru, která je ze dvou stran obklopena párem vnějším elektrod oddělených jen velice tenkou štěrbinou. Napětí vložené mezi vnější a centrální elektrodu vytváří elektrické pole, které je lineární s osou elektrody, proto je oscilace iontů v tomto směru čistě harmonická (*Perry, R.D. et al, 2008*). Ionty se v orbitrapu pohybují po stabilních trajektoriích okolo a podél středové elektrody. Frekvence oscilace iontů podél centrální elektrody vytváří na vnějších elektrodách indukovaný proud – signál, ze kterého se po jeho amplifikaci a Fourierově transformaci získá výsledné hmotnostní spektrum (*Zubarev, R.A. et al, 2013*). Obrovskou

výhodou orbitální pasti je schopnost analyzovat všechny ionty naráz, během jednoho měřicího cyklu. Může se jednat o molekulové ionty, nebo ionty vzniklé fragmentací parentních molekul. Vysoké rozlišení a vysoká přesnost měření umožňuje rozlišit individuální látky v komplexní směsi nejrůznějších molekul. Proto se Orbitrap stává vlajkovou lodí hmotnostně spektrometrických technik v analýze biologických systémů. Uplatňuje se v oblastech od rutinní identifikace neznámých látek, přes stopové analýzy v komplexních směsích, až po „omické“ vědy (proteomice, lipidomice, metabolomice) (**Zubarev, R.A. et al, 2013**).

### III. Detektory

Finálním krokem v analýze iontů je jejich detekce. V hmotnostní spektrometrii se nejčastěji využívá elektronásobič, fotonásobič nebo Faradayova klec (**Kool, J. et al, 2015; Hoffmann, E.D. et al, 2007**). Princip fungování elektronásobiče spočívá v emisi sekundárních elektronů po dopadu iontů. Elektrony jsou dále směřovány k dalším dynodám, dochází k nárůstu jejich počtu, až je získán měřitelný elektrický proud. Fotonásobič funguje obdobně, dopadající ionty na fosforovou desku emitují fotony, ty po dopadu na fotokatodu vyrážejí elektrony, jejichž počet je skrz soustavu dynod amplifikován. Faradayova klec využívá emisi elektronů z dynody po dopadu iontů, je generován elektrický proud, který je konvertován na signál. Elektrostatická orbitální past nebo FT-ICR nepotřebují detektor, protože oba analyzátoři zaznamenávají indukovaný proud s následnou přeměnou na signál.

#### 3.2.4 Validace bioanalytické metody

Validace analytické metody je součástí správné praxe (SLP) a označuje proces měření a ověřování, který má prokázat, že daná analytická metoda splňuje předem definované požadavky a je vhodná pro zamýšlené použití, např. kvantifikaci látek v daném biologickém materiálu. Řádně provedená validace bioanalytické metody pro kvantitativní stanovení analytů ve vzorku je naprosto klíčová pro správné provedení preklinických nebo klinických farmakokinetických studií. Validace metody experimentálně prokazuje, že kvantitativní metoda je spolehlivá a dokáže produkovat číselné hodnoty zatížené minimální chybou.

Požadavky na validaci bioanalytické metody jsou v současnosti definovány ve dvou základních dokumentech: I. *Guideline on Bioanalytical method validation* (European Medicines Agency, EMA) vydaná v roce 2011 (**EMA 2011**) a II. *Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry* (Food and Drug Administration, FDA) vydaná v roce 2018 (**FDA 2018**). Směrnice FDA z roku 2018 nahradila zastaralou z roku 2001 (**FDA 2001**) a pracovní verzi z roku 2013 (**FDA 2013**), které měly řadu nedostatků. Především nerefletovala rychlý rozvoj a využívání LC-MS (**Kadian, N. et al, 2016**). V současnosti je směrnice FDA 2018 velice podobná směrnici EMA 2011. I když mezi oběma doporučeními stále existují rozdíly (především v terminologii, vedení dokumentace a reportingu), validační parametry a kritéria jsou v podstatě totožné. Důkladné porovnání obou směrnic je shrnuto v práci Kaza M. a kol. (**Kaza, M. et al, 2019**). Protože směrnice EMA 2011 byla od svého zavedení vhodnější pro validaci LC-MS metod, řada pracovišť upřednostnila toto doporučení. Validační parametry vycházející ze směrnice EMA 2011 jsou: selektivita, přenos analytů, spodní limit kvantifikace, kalibrační křivka, přesnost, preciznost, diluční integrita, maticové efekt, výtěžnost a stabilita.

### 3.3 FARMAKOKINETIKA A METABOLISMUS

Farmakokinetika je stěžejním oborem farmakologie, který se zabývá osudem xenobiotika v organismu. Organismus různými mechanismy ovlivňuje jeho absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci. Aby léčivo uplatnilo svůj potenciál (farmakodynamický efekt), musí se do cílového místa dostat v určitém čase a dostatečném množství (*Khojasteh, S.C., 2011*).

Farmakokinetické hodnocení xenobiotik a jejich metabolizace se v posledních dvou desetiletích stala zcela klíčové v oblasti vývoje a hodnocení nových potenciálních léčiv. Díky předstutí těchto experimentů z klinických fází do fáze preklinické se dramaticky snížil počet ukončených klinických studií z důvodu nevýhodné farmakokineticky nebo metabolizmu (40 % v roce 1991 oproti 10 % v roce 2000) (*Kola, I. et al, 2008*). Preklinické hodnocení farmakokinetiky a metabolizmu je o to důležitější u látek na které je kladen požadavek efektivního přestupu přes orgánové bariéry. *In vitro* účinná, netoxická a velice slibná látka může být na základě neschopnosti dosáhnout cílového kompartmentu (mozku) ihned vyřazena.

Farmakokinetika se zabývá procesy, které se podílejí na změnách koncentrací xenobiotika v organismu v závislosti na čase, a popisuje je vhodnými veličinami – tzv. farmakokinetickými parametry. Existuje několik zjednodušených farmakokinetických modelů, buď schématických nebo matematických, pomocí kterých se číselně vyjadřují časové děje absorpce, distribuce a eliminace (*Khojasteh, S.C., 2011*).

U farmakokinetických studií se stanovuje závislost koncentrace léčiva v plazmě, nebo jiném materiálu, na čase (*Khojasteh, S.C., 2011; Lincová, D. et al, 2007*). K vyjádření této závislosti se v praxi nejčastěji využívá dvou přístupů, I. kompartmentová metoda, a II. nekompartmentová metoda (*Fan, J. et al, 2014; Dostálek, M., 2006*). Volba mezi nekompartmentovou nebo kompartmentovou analýzou závisí především na účelu použití. Nekompartmentová metoda ve srovnání s kompartmentovou vyžaduje pouze malé množství vstupních dat. Proto je nekompartmentová analýza metodou volby u menších izolovaných studií (toxikologických, preklinických), kde se farmakokinetické parametry xenobiotika stanovují v rámci definované skupiny (např. potkaní samci kmene Wistar). Na druhou stranu, kompartmentové modely se s výhodou uplatňují především v hodnocení farmakokinetiky napříč různými studii, kde jsou FK parametry ovlivňovány věkem, pohlavím, rasou, renální a hepatální funkcí, nebo jinými vnějšími faktory. Kompartmentové modely dokážou na základě vstupních parametrů predikovat chování xenobiotika v organismu, nekompartmentové modely toho schopné nejsou (*Fan, J. et al, 2014*).

Osud léčiva v organismu je popisován čtyřmi základními fázemi – absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece. **Absorpce** je charakterizována rychlostí, jakou se léčivo dostává z místa aplikace do krevního oběhu. Závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva, lékové formě a lokálních podmínkách v místě aplikace. Absorpci lze popsat několika základními veličinami – absorpční konstantou ( $k_a$ ), biologickou dostupností ( $BA$ ) a nejvyšší dosažitelnou koncentrací ( $C_{max}$ ). **Distribuce** popisuje pohyb léčiva v organismu, především transfer ze systémové cirkulace do různých tkání a orgánů, a naopak transfer léčiva z tkání a orgánů do krevního oběhu po poklesu plazmatické koncentrace. Distribuce je děj založený především na dvou procesech. Pasivní difúzi neionizovaných látek skrz membrány, který probíhá do té doby, dokud není dosaženo rovnovážného stavu mezi jednotlivými kompartmenty, nebo aktivními ději influx/eflux, které za spotřeby energie přesunují molekuly přes biologické membrány. Distribuci můžeme popsat zdánlivým distribučním objemem ( $V_d$ ) nebo distribuční rychlostní konstantou ( $k_d$ ). **Metabolismus** léčiv nebo jiných xenobiotik především usnadňuje a zrychluje jejich eliminaci z organismu. Rozeznáváme dvě fáze biotransformačních reakcí. První fáze zahrnuje oxidaci, redukci nebo hydrolýzu parentních léčiv. Druhá fáze spočívá v kovalentním spojení léčiva, nebo

jeho metabolitu, s polární molekulou a vyloučením močí nebo žlučí. **Exkrece** léčiv probíhá buď v jejich nezměněné formě nebo ve formě metabolitů, a to prostřednictvím vylučováním do moči, žluči, ale i jiných tělních tekutin jako do mateřského mléka, potu nebo slin. Pro eliminaci plynů a těkavých látek je důležitá plicní exkrece. Eliminaci lze popsat eliminační konstantou ( $k_e$ ), celkovou clearance ( $Cl$ ) nebo biologickým poločasem ( $T_{1/2}$ ). (*Lincová, D. et al, 2007; Zhang, D. et al, 2012; Khojasteh, S.C., 2011*)

## 4 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práce je věnována bioanalytickému hodnocení nových inhibitorů acetylcholinesteráz, potenciálních léčiv pro léčbu Alzheimerovy demence. Bioanalytické hodnocení nových léčiv spadá do preklinické fáze testování. Hlavním cílem je popsat osud léčiva v organismu, tj. zjistit základní farmakokinetické parametry týkající se absorpce, distribuce a eliminace, včetně popisu metabolizace. Pro tyto účely bylo nutné vyvinout a validovat analytické metody pro stanovení vybraných látek v biologické matrici, které byly aplikovány při experimentech na laboratorních zvířatech. Pro účely identifikace *in vivo* metabolitů bylo nutné provést *in vitro* metabolické experimenty. Dílčí cíle disertační práce můžeme rozdělit do následujících bloků:

### **Bioanalytické hodnocení PC-37, PC-48, S-K1025 a S-K1026.**

- I. Vývoj a validace metody pro stanovení těchto látek v plazmě a mozgovém homogenátu potkana.
- II. Stanovení těchto látek i v dalších biologických matricích (moč, žluč, ledviny a játra) pro popis distribuce a eliminace.
- III. Provedení *in vitro* metabolických experimentů pomocí mikrozomů s následnou identifikací metabolitů *in vivo* u potkanů.
- IV. Aplikace vyvinutých bioanalytických metod do studia farmakokinetiky a metabolismu.

Během práce na bioanalytickém hodnocení těchto experimentálních látek vyvstala řada otázek. Jedna z klíčových byla zaměřena na vztah mezi strukturou molekuly donepezilu a její schopnosti přestupovat přes hematoencefalickou bariéru (HEB). Proto se v průběhu práce formuloval další cíl:

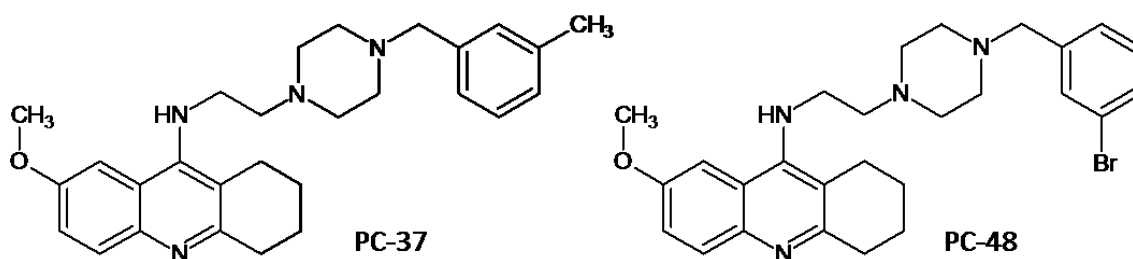
### **Identifikace části molekuly donepezilu zodpovědné za přestup přes HEB a akumulaci v mozku.**

- I. Vývoj a validace metody pro stanovení donepezilu a jeho fragmentů v plazmě a mozgovém homogenátu potkana.
- II. Aplikace vyvinuté bioanalytické metody do hodnocení farmakokinetiky a objasnění vztahu struktura-přestup do mozku.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE – KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACÍM

### 5.1 ANALYTICKÁ METODA PRO STANOVENÍ PC-37 A PC-48 V PLAZMĚ, HODNOCENÍ FARMAKOKINETICKÉHO PROFILU A METABOLIZACE

I když byl takrin vyřazen z klinické praxe především z důvodu hepatotoxických účinků, výzkum zaměřený na nalezení nových a bezpečnějších analogů vedl k objevení 7-methoxytakrinu (7-MEOTA). Jedná se o derivát takrinu, který byl poprvé syntetizován v České republice jako nová látka pro léčbu AD, a který je farmakologicky podobně aktivní, ale se značně redukovanou toxicitou (*Dejmek, L., 1990; Patocka, J., 1994*). Proto byl tento analog takrinu využit v syntéze nové skupiny látek vycházející ze spojení 7-MEOTY a donepezilu do jedné hybridní molekuly (**Obr. 7**). Jedná se o novou třídu hybridních molekul, duálních inhibitorů, které jsou schopné inhibovat obě cholinesterázy (AChE i BChE) a zároveň se vázat na PAS region AChE a tím zabraňovat agregaci A $\beta$  (*Korábečný, J. et al, 2014; Sepsova, V. et al, 2015*).



**Obr. 1:** Struktura hybridních molekul PC-37 a PC-48

PC-37 a PC-48 je kódové označení pro dvě látky, spadající mezi neselektivní inhibitory AChE. Jedná se o velmi potentní inhibitory, které v *in vitro* experimentech vykazují inhibiční vlastnosti v mikromolárních koncentracích. Látka PC-37 vykazuje o něco vyšší selektivitu vůči AChE ve srovnání s PC-48, která selektivněji inhibuje BChE. Bromem substituovaný benzyl derivát vykazuje přibližně stejnou AChE inhibiční aktivitu jako jeho metylovaný analog, ale z pohledu inhibice BChE je více než 2x účinnější. I když obě testované látky mají nižší inhibiční aktivitu vůči AChE v porovnání s takrinem nebo donepezilem, ve srovnání s bezpečnějším derivátem takrinu 7-methoxytakrinem jsou však o jeden řád účinnější, a dále ve srovnání s donepezilem jsou PC-37 i PC-48 efektivnějšími inhibitory BChE.

PC-37 i PC-48 jsou charakteristické svojí nízkou toxicitou. Experimenty hodnotící akutní toxicitu provedené na myších stanovily LD<sub>50</sub> včetně konfidenčního intervalu (*Kassa, J. et al, 2014*). Hodnota LD<sub>50</sub> pro PC-37 je 80,6 mg/kg (CI 62,9 – 102,6 mg/kg) a pro PC-48 279,8 mg/kg (CI 202,7 – 369,8 mg/kg). I když *in vivo* studie na myších hodnotící profylaktický a terapeutický účinek těchto látek vůči otravě organofosfátem somanem neprokázala statisticky významný efekt, PC-37 a PC-48 snižovaly aktivitu AChE v myším mozku (*Kassa, J. et al, 2014*). To poukazovalo na schopnost přestupu obou látek do mozku, což bylo podpořeno v další studii, která se zabývala *in vivo* účinností PC-37 a PC-48 na zlepšení kognitivních funkcí u myší v T-maze experimentu (*Misik, J. et al, 2015*). Látka PC-37 snížila *in vivo* mozkovou aktivitu AChE o 5,4 %, PC-48 dokonce o 11,3 %. V nastaveném experimentu navíc obě látky vykazovaly srovnatelné zlepšení kognitivních funkcí s donepezilem nebo takrinem.



Z výše uvedených studií vyplynulo, že se jedná velice o slibné látky, které prokázaly svoji účinnost v *in vitro* i *in vivo* experimentech. Proto stanovení základních farmakokinetických parametrů v centrálním a mozковém kompartmentu, popsání orgánové distribuce, identifikace metabolitů a určení primární cesty eliminace, byly primárními cíli naší práce. Pro tento účel bylo nutné vyvinout a validovat analytickou metodu pro stanovení hladin PC-37 a PC-48 v plazmě, mozku a dalších biologických materiálech potkanů.

Základním předpokladem pro stanovení koncentrací v různorodých biologických matricích a jejich úspěšné transformaci do farmakokinetické studie bylo vyvinutí analytické metody, která bude dostatečně citlivá (očekávané koncentrace PC-48 a PC-37 v plazmě byly v jednotkách až desítkách nanogramů na mililitr), ale zároveň bude mít širší kalibrační rozmezí a minimální matricové efekty pro použití v analýze dalších typů biologického materiálu – moč, mozek, periferní orgány a žluč. V době provádění experimentu naše pracoviště disponovalo pouze jediným, pro tyto účely vhodným, hmotnostním spektrometrem LTQ-XL (Thermo Fisher Scientific) s technologií lineární iontové pasti ve spojení s HPLC, a s možností využití ESI nebo APCI jako ionizačního zdroje. Nastavení parametrů hmotnostního spektrometru (MS) bylo optimalizováno pro dosažení co nejvyšší citlivosti se zachováním stability signálu. Vzhledem jednotkovému rozlišení hmotnostního spektrometru nebylo reálné provádět měření analytů ve Full-MS nebo SIM módu. Jedinou možnou variantou bylo provedení kolize molekuly s analýzou celého spektra vzniklých fragmentů, které poskytovaly potřebnou selektivitu.

Parametry vyvinuté chromatografické metody lze shrnout následovně (**příloha č. 1 disertační práce**): separace látek ve vzorku probíhala na koloně Ascentis Express RP-Amide (75 mm × 2.1 mm, 2.7 μm, Supelco Analytical) při teplotě 30 °C v gradientovém režimu při průtoku 400 μl/min. Mobilní fáze byla složena z vodné složky A (0,05 M kyseliny mravenčí), a organické složky B (acetonitril). Celková doba analýzy činila 6 min.

Vývoj a optimalizace extrakční metody spočíval v testování proteinové precipitace (PP) a extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) (**příloha č. 1 disertační práce**). Součástí vývoje extrakční metody byl i výběr vhodného vnitřního standardu. Metodu úpravy vzorku můžeme shrnout do následujícího protokolu. Do 4 ml polypropylenových zkumavek se ke 240 μl plazmy přidalo 10 μl IS, 100 ul 0,5M NaOH a 1,5 ml extrakční směsi ethylacetát:dichlormetan (80:20, v/v). Po krátkém promíchání na vortexu následovalo třepání na mechanické třepače (10 min), centrifugace (3 500 x g, 5 min) s následným odebráním a odpařením 1 ml supernatantu, a rekonstitucí ve 100 ul mobilní fáze.

Vyvinutá metoda pro stanovení PC-37 a PC-48 v potkaní plazmě byla úspěšně validována dle doporučení směrnice FDA (**FDA 2001**), směrnice EMA 2011 (**EMA 2011**) byla použita pouze pro hodnocení matricových efektů, které ve směrnici FDA z roku 2001 nejsou popsány. Pro ostatní typy biologické matrice byla provedena pouze částečná validace – hodnocena byla výtěžnost, matricové efekty a linearita. Ve všech třech parametrech byla splněna příslušná kritéria. Detaily validačního procesu včetně výsledků pro látku PC-48 lze nalézt v **příloze č. 1 disertační práce**.

Validovaná metoda byla následně aplikována ve studii zaměřené na stanovení farmakokinetických (FK) parametrů látek PC-37 a PC-48 u potkaních samců kmene Wistar. Potkanům byla ve dvou experimentálních skupinách intramuskulárně aplikovaná dávka PC-37 (4,03 mg/kg) a PC-48 (3,86 mg/kg) odpovídající 5 % LD<sub>50</sub>. Vzorky krve a orgánů byly odebírány v časových intervalech 5, 15, 30, 60, 120, 240 minut a 24 hodin, a následně zpracovány. Pro stanovení farmakokinetického profilu a výpočet základních FK parametrů byl zvolen standardní nekompartmentový model, který je pro tento typ experimentů nejvhodnější (**Fan, J. et al, 2014**). K výpočtům byl využit software Kinetica (verze 4.0). Obě látky dosáhly maximální

plazmatické koncentrace ( $T_{max}$ ) během několika minut s maximem ( $C_{max}$ )  $75,93 \pm 11,98$  ng/ml v čase 10,83 min pro PC-37 a  $39,09 \pm 4,45$  ng/ml v čase 5,00 min pro PC-48. PC-37 i PC-48 byly schopné prostoupit přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a akumulovat se v mozkové tkáni, kde jejich koncentrace násobně překonaly koncentrace plazmatické. Parametr  $K_p$  (poměr plochy pod křivkou  $AUC_{mozek}/AUC_{plazma}$ ) byl 5,41 pro PC-37 a 2,11 pro PC-48. Podobnější farmakokinetická data jsou uvedena v **příloze č. 2 disertační práce**. Pokud vezmeme v potaz čistě fyzikálně-chemické vlastnosti obou látek a zhodnotíme jejich teoretickou schopnost prostupovat přes HEB, tak Lipinského „pravidlo pěti“ (**Lipinski, C.A. et al, 2001**) nebo novější kritéria dle Pajouheshy (**Pajouhesh, H., 2005**) splňuje pouze PC-37 (**Tab. 2**) – PC-48 vyhovuje pouze ve čtyřech ze šesti parametrů. Obě látky dosáhly vyšších koncentrací v mozkové tkáni ve srovnání s plazmou, musí zde tedy existovat aktivní transportní mechanismus. Na základě naší následující studie (**příloha č. 3 disertační práce**), která se zabývala identifikací části molekuly donepezilu zodpovědné za aktivní přestup přes HEB, se můžeme přiklonit k tvrzení, že benzylpiperazinová část molekuly PC látek (pocházející z molekuly donepezilu) umožňuje tento aktivní transport PC-37 a PC-48. Aktivní transport je zřejmě zprostředkován organickými kationtovými transportéry (OCTs, Organic Cation Transporters), stejně jako u donepezilu (**Kim, M.H. et al, 2010**).

Parametr	PC-37	PC-48	Lipinského "Pravidlo pěti"	Pajouheshova kritéria
Molekulová hmotnost (g/mol)	444,29	508,18	<500	<450
log P	4,88	5,13	<5	<5
Počet donorských vodíkových vazeb	1	1	<5	<3
Počet akceptorových vodíkových vazeb	5	5	<10	<7
Počet rotujících vazeb	7	7	<10	<8
TPSA (Å <sup>2</sup> )	40,63	40,63		<60-70

TPSA – Topologická polární povrchová plocha molekuly

**Tab. 1:** Fyzikálně chemické vlastnosti PC látek; teoretické limity příslušných kritérií (červeně vyznačeny nevyhovující parametry dle Pajouheshových kritérií)

Orgánová distribuce obou látek byla relativně vysoká. PC-37 i PC-48 velice rychle pronikaly do jaterní i ledvinné tkáně s následným přestupem do žluči nebo moči. Vyšší koncentrace obou látek v ledvinách a moči poukazují ne převážně renální eliminaci. Biologický poločas obou látek byl řádově ve stovkách minut,  $827 \pm 142$  min pro PC-37 a  $1\ 065 \pm 246$  min pro PC-48. Ve srovnání s donepezilem (za podobných experimentálních podmínek) se jedná o přibližně desetinásobně delší eliminační poločas.

Metabolické profilování nových chemických entit je nezanedbatelná část v procesu vývoje a bioanalytického hodnocení nových léčiv. Přímá identifikace metabolitů PC-látek v biologickém materiálu (především moči) získaných z *in vivo* studie byla, vzhledem k nízkým plazmatickým koncentracím parentních látek, a tudíž i metabolitů, poměrně komplikovaný úkol. Z tohoto důvodu byly prvně provedeny metabolické experimenty v *in vitro* podmínkách s využitím lidských jaterních mikrozomů (vědomi si odlišnosti mezi lidským a potkaními mikrozomy). V těchto experimentech byly získány informace o metabolizaci PC-látek v rámci první fáze biotransformace, které jsme následně využili v *in vivo* studii.

Metabolická analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru LCQ Fleet IT/MS. Pro chromatografickou separaci byla zvolena delší core-shell kolona Kinetex C18 (100 x 3 mm ID, 2,6 µm, Phenomenex, Torrance, USA) s pomalou gradientovou elucí a průtokem 0,3 ml/min. Celkový

čas analýzy 38 min zajistil dostatečnou separaci vzniklých metabolitů. Pro správné provedení a následné hodnocení metabolizace bylo klíčové nastavení algoritmu hmotnostně-spektrometrické analýzy. To spočívalo v provedení Full-MS analýzy (sken celého spektra v rozmezí 150-1000  $m/z$ ) v kombinaci s data-dependentním skenováním, pomocí kterého se automaticky spouštěly fragmentace vybraných parentních iontů až do úrovně  $MS^3$ . Tím byla získána potřebná fragmentační spektra pro odvození struktury metabolitů. Analýzy byly provedeny v pozitivním módu s využitím ionizačního zdroje ESI i APCI. Kombinace obou těchto ionizačních přístupů je vhodná především pro spolehlivou identifikaci *N*-oxidů, jejichž tvorbu jsme vzhledem k přítomnosti dvou terciárních aminů v molekule PC-37 i PC-48 očekávali. Rozlišení *N*-oxidu od hydroxylovaného metabolitu je umožněno díky unikátní fragmentaci, která je výsledkem termální degradace molekuly během vlastní APCI ionizace (**Wang, X. et al, 2010; Ibrahim, H. et al, 2013**). Fragmentace v APCI zdroji spočívá v ztrátě atomu kyslíku (vázaného v *N*-oxidu) z molekuly, takže ve výsledném spektru převažuje hmota odpovídající ztrátě 16 Da, hmota parentního *N*-oxidu je zastoupena jen minoritně. U ESI k samovolné deoxygenaci nedochází, proto ve spektru dominuje hmota odpovídající *N*-oxidu. Detailní informace o provedení metabolických experimentů lze nalézt v **příloze č. 2 disertační práce**.

V *in vitro* experimentech s lidskými mikrozomy se nám podařilo identifikovat celkem devět metabolitů látky PC-37 a osm metabolitů látky PC-48. U obou látek docházelo k enzymatické hydrolýze vazby spojující piperazinový kruh a methylenovou skupinu připojující substituovaný benzen. Přítomny byly různé mono a dihydroxylované metabolity, *O*-desmetyl metabolit a také *N*-oxid. Přesný popis jednotlivých metabolitů obou látek je uveden v. Je důležité zmínit, že u řady metabolitů se nám nepodařilo určit přesné místo biotransformace. Týká se to především hydroxylace na aromatické části molekuly nebo etylenovém můstku. V těchto případech, pro přesné určení polohy hydroxymetabolitů, by bylo nutné využít nukleární magnetickou rezonanci (NMR).

Přesně definované struktury metabolitů z *in vitro* inkubace byly následně využity pro screening metabolitů v rámci *in vivo* experimentu. Ten byl proveden na hmotnostním spektrometru Q-Exactive Focus s využitím stejných chromatografických podmínek jako v případě *in vitro* experimentu. Metabolity byly identifikovány ve vzorcích moči odebraných 120 min a 24 h po aplikaci látky. Porovnání *in vitro* a *in vivo* metabolitů bylo provedeno na základě nastavených podmínek: I. retenční čas (<0,05 min), II. správné určení  $m/z$  parentního iontu (<2 ppm) a III. počet identifikovaných fragmentů (>3). Abychom považovali nález metabolitu v *in vivo* experimentu jako průkazný, musel vyhovět ve všech nastavených podmínkách. V obou vzorcích moči se u látky PC-37 podařilo identifikovat sedm metabolitů z celkového počtu devíti dříve popsanych v *in vitro* experimentu, u látky PC-48 bylo prokázáno šest metabolitů z osmi. U obou PC látek nebyly v *in vivo* experimentu ve srovnání s *in vitro* nalezeny dva metabolity odpovídající *O*-desmetylaci a *N*-oxidaci. Nepřítomnost těchto dvou metabolitů může být vysvětlena buď jejich příliš nízkými koncentracemi v moči, které neumožnily spolehlivý průkaz, nebo odlišnou biotransformací mezi lidským a potkaním metabolickým aparátem. Detailní výsledky metabolických experimentů lze nalézt v **příloze č. 2 disertační práce**.

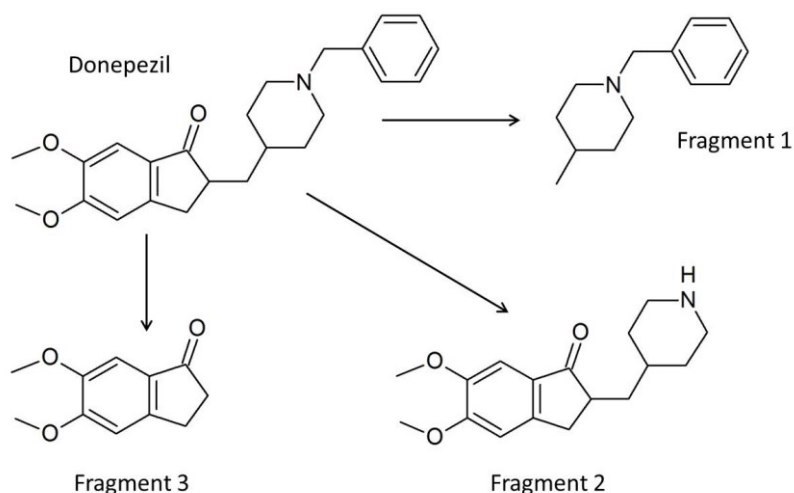
## 5.2 ANALYTICKÁ METODA PRO STANOVENÍ DONEPEZILU A JEHO TŘÍ FRAGMENTŮ V PLAZMĚ A MOZKU, HODNOCENÍ FARMAKOKINETICKÉHO PROFILU

Donepezil je inhibitor AChE široce užívaný v léčbě AD, jehož klíčovou rolí je především stabilizace kognitivních funkcí. Mimo to zlepšuje neuropsychiatrické symptomy, jako jsou

halucinace, apatie nebo postižení motorických funkcí. Donepezil působí jako rychlý, selektivní reverzibilní kompetitivní/nekompertitivní inhibitor AChE, který má jen velmi omezenou afinitu k BChE – poměr AChE:BChE u lidí je 405:1 (Jelic, V. et al, 2010). Tím se vysvětluje jeho nízká incidence periferních cholinergních nežádoucích účinků, především v gastrointestinálním traktu (Chewakriengkrai, L. et al, 2013). Donepezil spadá do kategorie duálních inhibitorů – je schopen inhibovat aktivitu AChE a zároveň snižovat schopnost agregace A $\beta$  (Bartolini, M. et al, 2003). Mimo jiné má řadu i dalších pozitivních vlastností: redukuje excitační působení glutamátu (Takada-Takatori, Y. et al, 2006), poškození neuronů (Nordberg, A. et al, 2006), mozkovou ischémii (Chen, X. et al, 2006) a oxidační stres (Tsukada, H. et al, 2000).

Donepezil je léčivo s atraktivním farmakokinetickým a farmakodynamickým profilem, které je často využíváno v syntéze nových hybridních molekul s nejrůznějšími terapeutickými cíli (Ismaili, L. et al, 2017). Donepezil je schopen aktivně přestupovat přes HEB a akumulovat se v mozku (Matsui, K. et al, 1996; Valis, M. et al, 2017), a tato vlastnost je očekávána i u nově navržených hybridních molekul. Nicméně, v literatuře dosud nebylo popsáno, která konkrétní část struktury donepezilu je primárně zodpovědná za aktivní transport molekuly přes HEB. Molekula donepezilu je poměrně velká, proto se pro syntézu nových hybridních molekul využívá zpravidla jen její část (Ismaili, L. et al, 2017). Znalost konkrétní části molekuly donepezilu zodpovědné za její aktivní transport přes HEB může být důležitou informací, která by mohla být využita při *in silico* navrhování nových potenciálních léčiv se schopností aktivního transportu.

Pracovní hypotéza byla založena na jednoduchém předpokladu – pokud je některá z částí molekuly donepezilu zodpovědná za aktivní přesun celé molekuly přes HEB, bude i tato část, jako samostatná jednotka, vykazovat podobnou vlastnost. Molekula donepezilu proto byla rozdělena na 3 logické části – fragment 1 (1-benzyl-4-methylpiperidin), fragment 2 (5,6-dimethoxy-2-[(piperidin-4-yl)methyl]-2,3-dihydro-1H-inden-1-on) a fragment 3 (5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-on) (Obr. 2). Schopnost aktivního přestupu přes HEB byla hodnocena na základě farmakokinetického profilu jednotlivých látek, především parametru K<sub>p</sub>, odvozeného z celkové plochy pod křivkou látky v mozku a plazmě ( $K_p = AUC_{\text{mozek}}/AUC_{\text{plazma}}$ ), který vyjadřuje míru přestupu analytu z plazmy do mozku a jeho akumulaci.



**Obr. 2:** Testované fragmenty 1-3 vycházející z molekuly donepezilu

Před provedením farmakokinetické studie musela být vyvinuta a plně validována analytická metoda pro kvantitativní stanovení donepezilu a jeho tří fragmentů v plazmě a mozku. Základním

požadavkem na metodu bylo dosažení dostatečné citlivosti (LLOQ = 0,5 ng/ml) pro všechny čtyři látky a jejich stanovení v jedné analýze. Navržené fragmenty donepezilu byly poměrně malé hůře ionizovatelné molekuly s „chudou“ fragmentací, což bylo spojeno s problémovou selektivitou a citlivostí. Proto byl pro tento experiment zvolen hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením Q-Exactive Focus spojený se systémem UHPLC Ultimate 3000 RS pump Dionex (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Vysoké rozlišení ( $R = 70\,000$ ) a správnost určení  $m/z$  (<2 ppm s využitím interní kalibrace) zajistilo dostatečnou selektivitu metody v obou materiálech bez nutnosti provádět fragmentaci molekuly, která v našem případě byla spojena poklesem intenzity signálu. Analyty jsme stanovovali jako molekulové ionty  $[M+H]^+$  v SIM modu (selektivní záznam iontů). Využití SIM modu oproti klasickému Full-MS modu (záznamu celého spektra) přináší výhodu především ve zvýšení citlivosti metody.

V rámci vývoje chromatografické metody byla vybrána UHPLC kolona Luna Omega 1,6  $\mu\text{m}$  Polar C18 (50  $\times$  2,1 mm ID; Phenomenex). Separace probíhala v gradientovém módu s využitím 0,1% HCOOH ve vodě a 0,1% HCCOH v ACN/MeOH (50/50 v/v) při průtoku 0,6 ml/min.

Vyvinutým extrakčním postupem byla LLE pomocí MTBE (s úpravou pH), což bylo přijatelným kompromisem ve výtěžnosti jednotlivých látek. Např. nízká (ale opakovatelná) výtěžnost fragmentu **1** z plazmy (cca 35 %) a mozku (cca 21 %) byla akceptovatelná, a to především díky dostatečné intenzitě signálu při hmotnostně spektrometrické detekci, která umožňovala spolehlivou kvantifikaci i při násobně nižších koncentracích látky. Z palety testovaných vnitřních standardů byl, s ohledem na linearitu metody a matricové efekty v obou biologických materiálech (plazma, mozek), vybrán sufentanil- $d_5$  jako nejvhodnější IS pro všechny čtyři analyty.

Validaci analytické metody jsme provedli dle doporučení EMA (**EMA 2011**) a FDA (**FDA 2001**) pro oba typy biologické matrice. Ve všech parametrech byla splněna nastavená kritéria a metoda mohla být použita pro provedení farmakokinetické studie. Výsledky validačních měření u obou typů biologického materiálu byly v podstatě totožné. Jediný významný rozdíl byl ve výtěžnosti analytů, kde bylo ve všech čtyřech případech dosaženo výrazně nižších (ale opakovatelných) výtěžností ze vzorků mozku. Veškerá data týkající se analytické metody a validace lze nalézt v **příloze č. 3 disertační práce**.

Z naměřené farmakokinetické studie byl získán koncentrační profil a následně byly dopočítány farmakokinetické parametry donepezilu a jeho tří fragmentů v plazmě a mozku. Fyzikálně-chemické vlastnosti donepezilu a jeho tří fragmentů **1**, **2** a **3** splňovaly Lipinského i Pajouheshova kritéria pro teoretický přestup molekul přes HEB (**Tab. 2**) – na tomto základě jsme mohli očekávat alespoň měřitelné koncentrace analytů v mozkové tkáni.

Parametr	Donepezil	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Lipinského "Pravidlo pěti"	Pajouheshova kritéria
Molekulová hmotnost (g/mol)	379,21	189,15	289,17	192,08	<500	<450
log P	4,21	3,05	2,10	1,52	<5	<5
Počet donorských vodíkových vazeb	0	0	1	0	<5	<3
Počet akceptorových vodíkových vazeb	4	1	4	3	<10	<7
Počet rotujících vazeb	6	2	4	2	<10	<8
TPSA ( $\text{Å}^2$ )	38,77	3,24	47,56	35,53		<60-70

TPSA – Topologická polární povrchová plocha molekuly

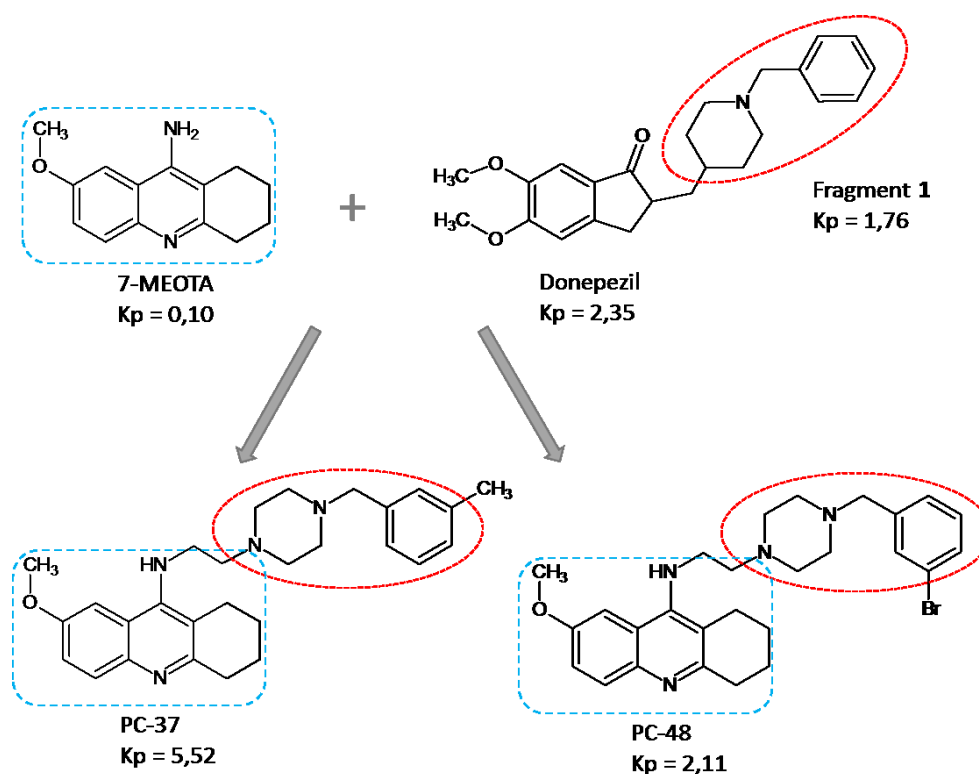
**Tab. 2:** Fyzikálně chemické vlastnosti donepezilu a fragmentů 1-3; teoretické limity příslušných kritérií (červeně vyznačeny nevyhovující parametry dle Pajouheshových kritérií)

Donepezil dosáhl svojí maximální plazmatické koncentrace  $C_{max} = 48,74$  ng/ml v čase 8,33 min, maximální koncentrace v mozku  $C_{max} = 75,42$  ng/mg dosáhl o několik minut později – v čase 27,50 min. Už z parametru  $C_{max}$  je patrné, že donepezil prostupuje do mozku v daleko větší míře, než by mohlo odpovídat pouhé pasivní difuzi. Na existenci aktivního transportu lze usuzovat i z poměru ploch pod křivkou mozku a plazmy ( $K_p = AUC_{mozek}/AUC_{plazma}$ ), který činí 2,35. Tento náleží je očekávaný, řada publikací uvádí podobné výsledky (**Geerts, H. et al, 2005; Kim, M.H. et al, 2010**). Kim se svými kolegy (**Kim MH 2010**) prokázali, že aktivní transport donepezilu přes HEB je zprostředkován primárně organickými kationtovými transportéry (OCTs). Afinita donepezilu k jednotlivým subtypům OCTs klesá v řadě OCT1, OCT3, OCTN2, OCTN1 a OCT2 (**Kim, M.H. et al, 2010**).

U fragmentu **3**, malé planární molekuly, jsme očekávali alespoň částečný přestup do mozku. Předpoklad se v naší studii potvrdil ( $K_p = 0,49$ ). Fragment **3** velmi rychle prostupuje do mozku, kde dosahuje své maximální koncentrace přesně ve stejný čas jako v plazmě ( $T_{max} = 6,67$  min pro plazmu i mozek). Koncentrace v mozku i plazmě však velmi rychle klesá, ve srovnání s fragmentem **1** nebo **2** je rychlost eliminace fragmentu **3** přibližně 10x vyšší. Již ve 120. minutě po aplikaci jsme fragment **3** nebyli schopni detekovat (limit detekce v plazmě byl 0,1 ng/ml, v mozku 0,2 ng/mg). Ve srovnání s fragmentem **3**, fragment **2** (methylpiperidinový derivát fragmentu **3**) prostupuje do mozku jen v omezené míře ( $K_p = 0,19$ ) a jeho maximální koncentrace  $C_{max}$  v mozku dosahuje hodnot pouze 3,48 ng/mg (ve srovnání s plazmou kde  $C_{max} = 51,31$  ng/ml). Protože molekula fragmentu **2** splňuje výše jmenovaná fyzikálně-chemická kritéria pro pasivní difúzi, předpokládáme, že zde musí existovat efektivní efluxní mechanismus, který molekulám fragmentu **2** neumožní prostoupit přes HEB.

Naproti tomu farmakokinetický profil fragmentu **1** (1-benzyl-4-methylpiperidin), který má podobnou molekulovou hmotnost jako fragment **3** a také splňuje veškerá fyzikálně-chemická kritéria pro přestup přes HEB, vykazuje přítomnost aktivního a/nebo přenašečem zprostředkovaného (carrier-mediated) transportu do mozku ( $K_p = 1,76$ ). Fragment **1**, podobně jako donepezil, dosahuje vyšší maximální koncentrace v mozku ( $C_{max} = 48,51$  ng/mg) v porovnání s plazmou ( $C_{max} = 20,98$  ng/ml).

Na základě porovnání  $K_p$  parametru všech tří fragmentů a donepezilu můžeme konstatovat, že 1-benzyl-piperidinová skupina ve struktuře donepezilu (reprezentován fragmentem **1**) může být zodpovědná za aktivní transport molekuly přes HEB. Tento závěr můžeme podpořit i výsledky z naší předcházející studie, která se zabývala farmakokinetickým profilem látek PC-37 a PC-48. Obě tyto látky, vzniklé spojením molekuly donepezilu a 7-methoxytakinu (7-MEOTA), obsahují ve své struktuře isosterický benzylpiperazin (**Obr. 2**). PC-37 i PC-48 vykazují farmakokinetický profil podobný donepezilu – po *i.m.* aplikaci PC látek jejich koncentrace v mozku převyšují plazmatické hladiny ( $K_p = 5,52$  pro PC-37,  $K_p = 2,35$  pro PC-48), a jejich eliminace z mozkové tkáně je výrazně pomalejší než z plazmy. Detailní informace o farmakokinetických parametrech jsou uvedeny v **příloze č. 3 disertační práce**. Naopak 7-MEOTA prostupuje do mozku jen ve velmi omezené míře ( $K_p = 0,1$ ; nepublikovaná experimentální data), což je značný rozdíl ve srovnání s takrinem, jehož koncentrace v mozku trojnásobně převyšují koncentrace v plazmě (**Baldwin, H.A. et al, 1991**). V konečném důsledku připojení substituovaného benzylpiperazinu k molekule 7-MEOTA je spojeno nejen se zvýšením inhibiční aktivity vůči AChE a BChE a snížením agregace amyloidu beta (**Korábečný, J. et al, 2014; Sepsova, V. et al, 2015**), ale také umožňuje aktivní transport celé molekuly přes HEB. Fragment **1** (1-benzyl-4-methylpiperidin) proto můžeme považovat za zajímavou strukturu v syntéze nových centrálně působících léčiv proti AD.

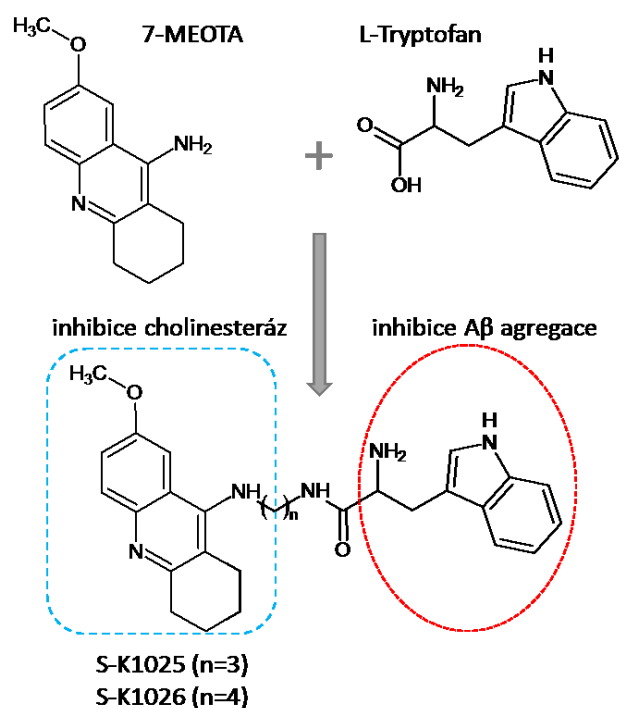


Obr. 2: Schématické znázornění struktury PC látek

### 5.3 ANALYTICKÁ METODA PRO STANOVENÍ S-K1025 A S-K1026 V PLAZMĚ A MOZKU POTKANŮ, HODNOCENÍ FARMAKOKINETICKÉHO PROFILU A METABOLIZACE

S-K1025 a S-K1026 patří mezi skupinu látek s kódovým označením S-K, které byly syntetizovány na základě strategie „*multi-target-directed ligands*“ (MTDLs) – vznikly spojením různě substituované molekuly takrinu a aminokyseliny *L*-tryptofanu (*L*-Trp) (**příloha č. 4 disertační práce**). Látky S-K1025 a S-K1026 jsou odvozeny od 7-methoxytakrinu (7-MEOTA), analogu takrinu s významně redukovanou toxicitou (**Soukup, O. et al, 2013**). S molekulou *L*-Trp je 7-MEOTA spojena prostřednictvím alkylového můstku (tzv. „linkeru“), jehož odlišná délka tvoří jediný strukturální rozdíl mezi S-K1025 ( $n = 3$ ) a S-K1026 ( $n = 4$ ) (**Obr. 3**). Rozdíl jediného metylenu v alkylovém můstku výrazně ovlivnil specifitu látek vůči AChE a BChE – zatímco S-K1025 je vůči oběma enzymům nespecifická, S-K1026 inhibuje převážně BChE.

*L*-Trp, aromatická esenciální aminokyselina, je prekurzorem serotoninu, který je významným neurotransmiterem. Řada studií prokázala, že tryptofan hraje důležitou roli v patogenezi Alzheimerovy demence (**Jenkins, T.A. et al, 2010**). Přítomnost *L*-Trp v syntetizovaných molekulách S-K1025 a S-K1026 je zodpovědná za inhibici agregace  $A\beta_{42}$  (přibližně o 50 %), zatímco 7-MEOTA tuto schopnost postrádala (**příloha č. 4 disertační práce**). Dalším významným benefitem tryptofanu je schopnost snižovat tvorbu oxidu dusnatého prostřednictvím inhibice enzymu NOS (NO-syntáza), jehož nadprodukce je spojena s patogenezí AD – obě látky inhibují aktivitu NOS (na úrovni  $IC_{50}$ ) v mikromolárních koncentracích.



**Obr. 3:** Schématické zobrazení struktury S-K látek

S-K1025 a S-K1026 dle svých fyzikálně-chemických vlastností splňují Lipinského „pravidlo pěti“ - z pohledu těchto kritérií lze očekávat pasivní difuzi přes HEB. Nicméně dle aktuálnějších kritérií (Pajouheshova kritéria) obě látky nevyhovují hned ve čtyřech parametrech ze šesti sledovaných (**Tab. 4**) – na základě těchto parametrů se dá usuzovat, že pokud bude přestup přes HEB probíhat, tak pravděpodobně pouze v omezené míře. K tomuto teoretickému předpokladu se přiklání i výsledky *in vitro* experimentu hodnotícího permeabilitu látek přes arteficiální membránu. Omezená schopnost pasivní difuze přes HEB však tyto látky automaticky nezařazuje do kategorie nevhodných kandidátů. Pro centrálně působící látku je mnohem důležitější schopnost aktivního transportu přes HEB, který by zajistil dostatečné koncentrace v mozku. *L-Trp* se do mozku dostává prostřednictvím aktivního transportu pomocí tzv. L1 systému (Leucin-preferující přenašeče), který je nejvýznamnější z pohledu objemu transportovaného tryptofanu (**Hawkins, R.A. et al, 2006**). Proto v důsledku přítomnosti *L-Trp* v molekule S-K1025 a S-K1026 lze předpokládat, že obě látky budou aktivně přestupovat přes HEB.

Vzhledem k zajímavým farmakodynamickým vlastnostem obou látek, nízké cytotoxicitě a reálného předpokladu pro dosažení cílového orgánu – mozku, bylo dalším cílem popsání farmakokinetického chování, zhodnocení přestupu přes HEB a popis *in vitro/vivo* metabolizace. Provedení farmakokinetického experimentu bylo stejné jako v případě PC látek nebo fragmentů donepezilu. Využili jsme samce potkanů kmene Wistar, kterým byla *i.m.* aplikována látka S-K1025 nebo S-K1026 v dávce odpovídající 5 % LD<sub>50</sub>. Pro farmakokinetickou analýzu byla použita nekompartmentová metoda.

Před provedením farmakokinetické studie bylo nutné zavést a validovat dostatečně citlivou kvantitativní metodu pro stanovení S-K1025 a S-K1026 v plazmě a dalších biologických matricích. Pro tyto účely jsme využili hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením Q-Exactive Focus spojený se systémem UHPLC Ultimate 3000 RS pump Dionex (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).



Parametr	S-K1025	S-K1026	Lipinského "Pravidlo pěti"	Pajouheshova kritéria
Molekulová hmotnost (g/mol)	471,26	485,28	<500	<450
log P	3,25	3,77	<5	<5
Počet donorských vodíkových vazeb	4	4	<5	<3
Počet akceptorových vodíkových vazeb	5	5	<10	<7
Počet rotujících vazeb	9	10	<10	<8
TPSA (Å <sup>2</sup> )	105,06	105,06		<60-70

TPSA – Topologická polární povrchová plocha molekuly

**Tab. 4:** Fyzikálně chemické vlastnosti S-K látek; teoretické limity příslušných kritérií (červeně vyznačeny nevyhovující parametry dle Pajouheshových kritérií)

Vzhledem k aplikovanému množství látek (65,32 mg/kg u S-K1025; 42,27 mg/kg u S-K1026) jsme očekávali relativně vyšší plazmatické koncentrace v porovnání s předcházejícími farmakokinetickými experimenty (PC látky nebo fragmenty donepezilu). Zvolený limit kvantifikace 1 ng/ml byl proto pro potřeby studie dostačující. Prvotní testování čistých standardů látek S-K1025 a S-K1026 ukázalo, že obě látky vzhledem k přítomnosti pěti atomů dusíku v molekule dobře ionizují a poskytují intenzivní signál i při této koncentraci. Z těchto důvodů jsme neočekávali problémy s citlivostí. Následné testování blankových vzorků na specifitu stanovení neprokázalo žádný interferenční vliv složek matrice – S-K1025 a S-K1026 mohly být měřeny jako [M+H]<sup>+</sup> ionty bez nutnosti fragmentace molekuly. Z výše uvedených důvodů byl zvolen skenovací mód Full-MS se záznamem všech iontů v rozsahu 125–650 *m/z*, s rozlišením *R* = 70 000, a využitím polysiloxanu jako „lock-mass“ pro dosažení správnosti určení *m/z* <2 ppm. Výhoda použití skenovacího modu Full-MS spočívá především v získání kompletního záznamu všech analyzovaných iontů ve zvoleném rozsahu. To nám umožňuje retrospektivní hodnocení dat v případě potřeby, např. hodnotit relativní zastoupení jednotlivých metabolitů v již analyzovaných vzorcích bez nutnosti opakovat přípravu vzorků a jejich reanalýzu.

Vývoj chromatografické metody spočíval v testování různých typů chromatografických kolon (C18, fenyl-hexyl, pentafluorofenyl, bifenyl), složení mobilní fáze, průtokové rychlosti a velikosti nástřiku, vše s ohledem na zachování určité „hygieny“ chromatografického systému. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s použitím kolony Luna Omega 1,6 μm Polar C18 (50 × 2,1 mm ID; Phenomenex).

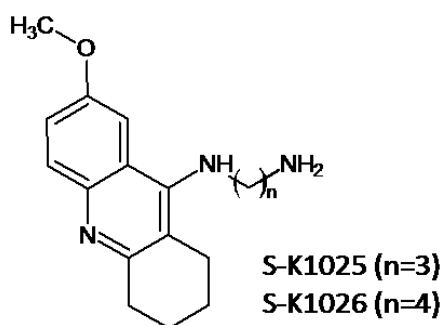
Pro extrakci S-K1025 a S-K1026 byla vyvinuta a optimalizována proteinovou precipitací pomocí metanolu, který obsahoval celkem 10 potenciálních vnitřních standardů (IS). To umožnilo v rámci validačního procesu vybrat nejvhodnější IS pro oba analyty, především z pohledu linearity kalibrační závislosti a matricových efektů.

Validace analytické metody pro stanovení S-K1025 a S-K1026 v plazmě byla provedena dle doporučení EMA (**EMA 2011**) a FDA (**FDA 2001**). U vzorků mozku byla provedena pouze částečná validace – byla hodnocena výtěžnost, matricové efekty a linearita. Validovaná metoda byla využita pro naměření farmakokinetické studie, byl získán koncentrační profil obou látek a vypočítány jejich základní farmakokinetické parametry. Veškerá data týkající se vývoje a validace analytické metody lze nalézt v **příloze č. 5 disertační práce**.

S-K1025 dosáhla přibližně o třetinu vyšší maximální plazmatické koncentrace (*C*<sub>max</sub> = 409,14 ng/ml) než S-K1026 (*C*<sub>max</sub> = 306,15 ng/ml). Tento rozdíl byl očekávatelný vzhledem k vyšší aplikované dávce S-K1025. Obě látky jsou charakterizovány velmi vysokým zdánlivým distribučním objemem (*V*<sub>d</sub> = 630,98 l/kg pro S-K1025, *V*<sub>d</sub> = 419,41 l/kg pro S-K1026). Ten můžeme

vysvětlit buďto relativně vysokým  $\log P$  obou látek (**Tab. 4**), akumulací bazických skupin v lipofilní molekule, nebo rychlou eliminací z plazmy ať už metabolizací nebo exkrecí (**Smith, D.A. et al, 2015**).

Analýzou vzorků mozků bylo prokázáno, že látky S-K1025 ani S-K1026 neprostupují přes HEB. V žádném z odebraných vzorků mozku nebyly látky detekovány ani ve stopovém množství, přičemž limit detekce odpovídal 0,2 ng/ml pro S-K1025, a 0,1 ng/ml pro S-K1026. Původní předpoklad založený na možnosti aktivního transportu látek díky přítomnosti *L*-Trp v molekule prostřednictvím L1 transportního systému nebyl potvrzen. Vystává zde hned několik možných vysvětlení: **I.** z pohledu fyzikálně-chemických vlastností obě látky nesplňují příslušné teoretické atributy (**Pajouhesh, H., 2005**), **II.** látky s topologickou polární povrchovou plochou molekuly větší než 70 Å<sup>2</sup> a s více než dvěma donorovými vodíkovými vazbami jsou daleko častěji rozpoznávány P-glykoproteinem (**Hitchcock, S.A. et al, 2012**), **III.** karboxyesterázy přítomné v HEB a mozku mohou hydrolyzovat amidovou funkční skupinu (**Satoh, T. et al, 2006; Jones, R.D. et al, 2013**), která u obou látek propojuje části 7-MEOTA a *L*-Trp. Metabolické experimenty v *in vitro* i v *in vivo* podmínkách prokázaly, že amidová skupina u obou látek velmi ochotně podléhá hydrolyze za vzniku metabolitu M1 (**Obr. 4**). Díky retrospektivnímu vyhodnocení dat z naměřené farmakokinetické studie plazmy a mozku bylo prokázáno, že M1 metabolit je schopen zřejmě pasivním transportem přestupovat přes HEB – v 60. minutě koncentrace M1 v mozковém homogenátu dosahuje 30-50 % jeho plazmatické koncentrace.



**Obr. 4:** Metabolit M1

Identifikace a popsání metabolitů S-K1025 a S-K1026 v podmínkách *in vitro/vivo* byla další součástí této práce. K hodnocení a popisu všech struktur/fragmentů byly použity programy ChemCalc (**Patiny, L. et al, 2013**) a ACD/ChemSketch (v 14.01).

Kompletní metabolická analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením Q-Exactive Focus. Screening neznámých metabolitů byl proveden ve dvou fázích. V první necílená analýza vzorků s využitím skenovacího módu Full-MS/AIF (AIF, All Ion Fragmentation), který kombinoval záznam celého spektra  $[M+H]^+$  iontů se záznamem fragmentačního spektra vzniklého kolizí všech dostupných iontů. Na základě přesného určení  $m/z$  analytů, jejich izotopových obálek a generovaných fragmentů byl sestaven seznam potenciálních metabolitů. Druhá fáze spočívala v provedení analýz v tzv. PRM módu (Parallel Reaction Monitoring), který umožnil získat celé fragmentační spektrum látky o definovaném  $m/z$ , a tím jednoznačně určit o jaký typ metabolitu se jedná.

U obou látek se v *in vitro* experimentu s lidskými jaterními mikrozomy podařilo identifikovat celkem 13 metabolitů první fáze. Shodný počet i typ identických metabolitů může být vysvětlen vysokou podobností obou látek, které se liší pouze v délce alkylového spojovacího řetězce (linkeru). Nejvíce zastoupeným metabolitem v chromatografickém záznamu je **M1** (tvoří přibližně

70 % celkového součtu plochy píků všech metabolitů), který vzniká enzymatickou hydrolýzou amidové vazby mezi spojovacím řetězcem a tryptofanem. Neenzymatické štěpení molekuly je málo pravděpodobné, protože u kontrolních inkubačních vzorků byl M1 nalezen jen ve stopovém množství. Obecně k dominantnímu zastoupení M1 přispívá i skutečnost, že i ostatní metabolity mohou být cílem enzymatické hydrolýzy a metabolizovat se na M1. Také v *in vivo* podmínkách je M1 jednoznačně nejvíce zastoupeným metabolitem, který je navíc schopen prostupovat i do mozku. Mezi další metabolity vzniklé enzymatickou hydrolýzou patří M2 a M3, které odpovídají ztrátě tryptofanové části se spojovacím řetězcem a *O*-demetylaci (M3) nebo hydrolýze s následnou hydroxylací (M2). Je pravděpodobné, že hydroxylace v místě nasyceného cyklu probíhá až po hydrolýze molekuly, protože se nepodařilo identifikovat metabolit odpovídající neštěpené parentní látce hydroxylované v místě tetrahydroakridinu. U všech identifikovaných hydroxy-metabolitů docházelo k hydroxylaci výhradně v tryptofanové části molekuly (M4, M5, M6, M7, M9a, M9b nebo M11). M9a a M9b dva různé metabolity se stejným číselným označením, které odpovídají hydroxylaci v oblasti benzenového jádra tryptofanu. Jejich rozlišení bylo možné pouze na základě rozdílných retenčních časů. Dále se nám podařilo identifikovat metabolity odpovídající *O*-demetylaci (M8), *N*-oxidaci (M10), oxidativní deaminaci (M12) a oxidativní deaminaci s hydroxylací (M11). Detailní informace o metabolickém profilování jsou uvedeny v **příloze č. 5 disertační práce**.

Na základě výsledků *in vitro* metabolického experimentu jsme v moči potkanů prokázali 7 metabolitů látky S-K1025 a 9 metabolitů S-K1026. Dominantní nález tvořil M1 metabolit, který v zastoupení předčil rozdílem řádů ostatní metabolity i parentní látku. Hydrolýza amidové vazby mezi tryptofanem a spojovacím řetězcem je tedy hlavní cestou metabolizace a následné eliminace látek S-K1025 a S-K1026.

## 6 ZÁVĚR

V předkládané disertační práci je v teoretické části věnována pozornost Alzheimerově demenci (AD), současné a nové strategii léčby AD, kapalinové chromatografii, hmotnostní spektrometrii, validaci metod a farmakokinetice. Experimentální část práce je věnována dvěma tématům: I. bioanalytickému hodnocení čtyř nových kandidátních léčiv proti AD, a II. vlivu struktury donepezilu a jeho strukturálních částí na transport přes hematoencefalickou bariéru (HEB). K získání spolehlivých kvantitativních výsledků pro farmakokinetické výpočty byly vyvinuty a validovány nové metody. Jednotlivé kandidátní látky byly hodnoceny na základě stanovených farmakokinetických parametrů a informací z metabolického profilování. Pozornost byla věnována především schopnosti látek přestupovat přes HEB.

Látky PC-37, PC-48, S-K1025 a S-K1026, byly syntetizovány jako hybridní molekuly na základě strategie „*multi-target-directed ligands*“, kde jediná chemická entita může zasáhnout několik farmakologických cílů současně. Jedná se o duální inhibitory, které jsou schopné inhibovat aktivitu obou cholinesteráz (AChE i BChE) a zároveň inhibovat agregaci amyloidu beta. U všech čtyřech látek byla prokázána vysoká účinnost a nízká toxicita, proto byly tyto látky zařazeny do preklinického bioanalytického hodnocení. Znalost farmakokinetických parametrů, zhodnocení rozsahu akumulace v mozku, a popisu metabolizace umožňuje racionalizovat postupy dalšího směřování ve vývoji léčiv s centrálním účinkem. Kandidátní látky mohou být posunuty do další fáze klinického hodnocení, vylepšeny a opět testovány, nebo rovnou vyřazeny.

Všechny čtyři testované látky vycházely ze struktury 7-methoxytakrinu (7-MEOTA), ke které byla připojena část molekuly donepezilu (PC-37 a PC-48) nebo tryptofan (S-K1025 a S-K1026). I

když PC a S-K látky jsou si svým farmakodynamickým profilem podobné, jejich chování v organismu je značně odlišné – především v prostupu přes HEB a schopnosti akumulace v mozku. Pokud bychom hodnotili vztah mezi strukturou látky a schopností procházet přes HEB, je vhodné zohlednit teoretické předpoklady vycházející z fyzikálně-chemických vlastností daných látek (např. Pajouheshova kritéria). Jediná PC-37 tato kritéria splňovala ve všech parametrech, PC-48 splňovala čtyři ze šesti, S-K1025 a S-K1026 vyhovovaly pouze ve dvou ze šesti. Nicméně na základě teoretických kritérií nelze kandidátní látky automaticky přijmout/vyřadit. Schopnost dosáhnout/nedosáhnout mozkové tkáně je nutné vždy experimentálně ověřit. *In vivo* experimenty prokázaly, že obě PC látky byly schopné pronikat přes HEB a akumulovat se v mozku, S-K látky se do tohoto orgánu nedostaly ani ve stopovém množství.

Samotný 7-MEOTA proniká do mozku jen v omezené míře ( $K_p = 0,1$ ). Proto můžeme předpokládat, pokud látka aktivně prostupuje přes HEB, je za tento proces zodpovědná druhá část hybridní molekuly – v případě PC látek se jedná o substituovaný benzylpiperazin pocházející z molekuly donepezilu. Přestože se v syntéze nových AD léčiv využívají různé části donepezilu, v literatuře dosud nebylo popsáno, která část molekuly je zodpovědná za jeho aktivní transport. Z tohoto důvodu byla provedena *in vivo* studie, ve které byla tato hypotéza experimentálně ověřena. Ve výsledku, pokud je k molekule 7-MEOTA připojena benzylpiperazinová skupina, hybridní molekuly PC-37 a PC-48 jsou aktivně transportovány přes HEB, a to i přes to, že PC-48 nesplňuje všechna teoretická (Pajouheshova) kritéria. Benzylpiperazin však není pouhým prostředkem k transportu, ale připojením k 7-MEOTA se řádově zvyšuje inhibiční aktivita celé molekuly vůči AChE/BChE a zároveň dochází k inhibici agregace  $A\beta$ . Z těchto důvodů můžeme benzylpiperazin považovat za zajímavou strukturu v syntéze nových centrálně působících AD látek.

V případě S-K látek je k molekule 7-MEOTA připojena aminokyselina tryptofan. Toto spojení také vede ke zvýšení inhibiční aktivity vůči cholinesterázám a k inhibici agregace  $A\beta$ . Přítomnost tryptofanu v molekule byla předpokladem pro zprostředkování transportu přes HEB. Nicméně dle výsledků z *in vivo* experimentů jsme mohli aktivní transport i pasivní difúzi obou S-K látek zcela vyloučit. Díky metabolickým experimentům bylo prokázáno, že slabinou molekuly je spojení 7-MEOTA a tryptofanu prostřednictvím amidové vazby, která velmi snadno podléhá enzymatické hydrolýze.

Popsali jsme chování čtyř nových potenciálních léčiv AD v organismu, vztah mezi jejich strukturou a transportem přes HEB, a identifikovali příčinu schopnosti/neschopnosti těchto látek prostupovat do mozku. I když nadějní kandidáti PC-37 a PC-48 neprošli do fáze klinického hodnocení (především z důvodů nízké aktivity ve srovnání s jinými látkami), a S-K1025 i S-K1026 byly vyřazeny pro jejich metabolickou nestabilitu, výsledky této disertační práce poskytují informace, které mohou přispět k racionalizaci syntézy nových účinnějších látek nebo látek s lepší farmakokinetikou.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

- ALZHEIMER'S ASSOCIATION, Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2015, **11**(3), 332–384.
- ANDERSEN, J.K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* 2004, **10** Suppl: S18-25.
- ANNESLEY, T.M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem.* 2003, **49**(7), 1041–1044.
- ATTA-UR-RAHMAN – CHOUDHARY, M.I. *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease.* Bentham Science Publishers, 2015. ISBN: 978-0-12-803959-5
- BALDWIN, H.A. - DE SOUZA, R.J. – SARNA, G.S. – MURRAY, T.K. – GREEN, A.R. – CROSS, A.J. Measurements of tacrine and monoamines in brain by in vivo microdialysis argue against release of monoamines by tacrine at therapeutic doses. *Br J Pharmacol.* 1991, **103**(4), 1946-1950.
- BARTOLINI, M. – BERTUCCI, C. – CAVRINI, V. – ANDRISANO, V. beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: Inhibition studies. *Biochem Pharmacol.* 2003, **65**(3), 407–416.
- BOLOGNESI, M.L. - BANZI, R. - BARTOLINI, M. - CAVALLI, A. - TAROZZI, A. - ANDRISANO, V. - MINARINI, A. - ROSINI, M.; -TUMIATTI, V. - BERGAMINI, C. – FATO, R. – LENZA, G. – HRELIA, P. – CATTANEO, A. – RECANATINI, M. – MELCHIORRE, C. Novel Class of Quinone-Bearing Polyamines as Multi-Target-Directed Ligands to Combat Alzheimer's Disease. *J Med. Chem.* 2007, **50**(20), 4882–4897.
- BRAAK, H. – BRAAK, E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991, **82**(4), 239–259.
- CASTRO, A. – MARTINEZ, A. Targeting beta-amyloid pathogenesis through acetylcholinesterase inhibitors. *Curr Pharm Des.* 2006, **12**(33), 4377-4387.
- CAVALLI, A. - BOLOGNESI, M.L. - MINARINI, A. - ROSINI, M. - TUMIATTI, V. - RECANATINI, M. - MELCHIORRE, C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J Med Chem.* 2008, **51**(3), 347-372.
- CUMMINGS, J. – LEE, G. - RITTER, A. – ZHONGB, K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018. *Alzheimers Dement (N Y).* 2018, **4**, 195–214.
- CUMMINGS, J.K. Treatment of Alzheimer's disease: current and future therapeutic approaches. *Rev Neurol Dis.* 2004, **1**(2), 60-69.
- DARVESH, S. – HOPKINS, D.A. – GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci.* 2003, **4**, 131-138.
- DEJMEK, L. 7-MEOTA, *Drug Future.* 1990, **15**, 126-129.
- DIAMANT, S. – PODOLY, E. – FRIEDLER, A. – LIGUMSKY, H. – LIVNAH, O. – SOREQ, H. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, **103**(23), 8628-8633.
- DOSTÁLEK, M. a kol. *Farmakokinetika.* Grada, 2006. ISBN: 8024714647
- DVIR, H. – SILMAN, I. – HAREL, M. – ROSENBERY, T.L. – SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact.* 2010, **187**(1-3), 10-22.
- EMA 2011 - Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, 2011. [cit 11.1.2019]

Dostupné z: [https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)

FAN, J. - DE LANNOY, I.A. Pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol.* 2014, **87**(1), 93-120.

FDA 2001 - US Food and Drug Administration, Guidance for industry – Bioanalytical method validation, 2001. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). [cit 11.1.2019]

Dostupné z: <http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf>

FDA 2013 - US Food and Drug Administration, Guidance for industry – Bioanalytical method validation, 2013 (Draft guidance). Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). [cit 11.1.2019]

Dostupné z: <http://academy.gmp-compliance.org/guidemgr/files/UCM368107.PDF>

FDA 2018 - Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration, 2018. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). [cit 11.1.2019]

Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf>

FEKETE, S. – KOHLER, I. – RUDAZ, S. – GUILLARME, D. Importance of instrumentation for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2014, **87**, 105-119. A)

GANGULI, M. – DODGE, H.H. – SHEN, C. – PANDAV, R.S. – DEKOSKY, S.T. Alzheimer disease and mortality: a 15-year epidemiological study. *Arch Neurol.* 2005, **62**, 779–784.

GEERTS, H. - GUILLAUMAT, P.O. - GRANTHAM, C. - BODE, W. - ANCIAUX, K. - SACHAK, S. Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits. *Brain Res.* 2005, **1033**(2), 186–193.

GRITTI, F. - GUIOCHON, G. The van Deemter equation: assumptions, limits, and adjustment to modern high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2013, **1302**, 1–13.

HAWKINS, R.A. - O'KANE, R.L. – SIMPSON, I.A. – VIÑA, J.R. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr.* 2006, **136**, 218-226

HAYES, R. – AHMED, A. – EDGE, T. – ZHANG, H. Core-shell particles: preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2014, **1357**, 36-52.

HITCHCOCK, S.A. Structural modifications that alter the P-glycoprotein efflux properties of compounds. *J Med Chem.* 2012, **55**(11), 4877-4895.

HOFFMANN, E.D. – STROOBANT, V. *Mass spectrometry: principles and applications.* 3rd ed. Wiley, 2007. ISBN: 978-0-470-03310-4

CHALUPOVA, K. - KORABECNY, J. - BARTOLINI, M. - MONTI, B. - LAMBA, D. - CALIANDRO, R. - PESARESI, A. - BRAZZOLOTTO, X. - GASTELLIER, A.J. - NACHON, F. - PEJCHAL, J. - JAROSOVA, M. - HEPNAROVA, V. - JUN, D. - HRABINOVA, M. - DOLEZAL, R. - ZDAROVA KARASOVA, J. - MZIK, M. - KRISTOFIKOVA, Z. - MISIK, J. - MUCKOVA, L. - JOST, P. - SOUKUP, O. - BENKOVA, M. - SETNICKA, V. - HABARTOVA, L. - CHVOJKOVA, M. - KLETECKOVA, L. - VALES, K. - MEZEIOVA, E. - ULIASSI, E. - VALIS, M. - NEPOVIMOVA, E. - BOLOGNESI, M.L. - KUCA, K. Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2019, **168**, 491-514.

- CHEEWAKRIENKRAI, L. - GAUTHIER, S. A 10-year perspective on donepezil. *Expert Opin Pharmacother.* 2013, **14**(3), 331–338.
- IBRAHIM, H. – COUDERC, F. – PERIO, P. – COLLIN, F. – NEPVEU, F. Behavior of N-oxide derivatives in atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2013, **27**(5), 621-628.
- ISMAILI, L. – REFOUVELET, B. – BENCHEKROUN, M. – BROGI, S. – BRINDISI, M. – GEMMA, S. – CAMPIANI, G. – FILIPIC, S. – AGBABA, D. – ESTEBAN, G. – UNZETA, M. – NIKOLIC, K. – BUTINI, S. – MARCO-CONTELLES J. Multitarget compounds bearing tacrine- and donepezil-like structural and functional motifs for the potential treatment of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2017, **151**, 4-34.
- JELIC, V. - DARREH-SHORI, T. Donepezil: A Review of Pharmacological Characteristics and Role in the Management of Alzheimer Disease. *Clin Med Insights Ther.* 2010, **2**, 771–788
- JENKINS, T. A. - ELLIOTT, J.J. - ARDIS, T.C. - CAHIR, M. - REYNOLDS, G.P. - BELL, R. - COOPER, S.J. Tryptophan depletion impairs object-recognition memory in the rat: reversal by risperidone. *Behav Brain Res.* 2010, **208**(2), 479-483.
- JOHNSON, G.V. – STOOHOFF, W.H. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. *J Cell Sci.* 2004, **117**(Pt 24), 5721–5729.
- JONES, R.D. - TAYLO, A.M. - TONG, E.Y. – REPA, J.J. Carboxylesterases are uniquely expressed among tissues and regulated by nuclear hormone receptors in the mouse. *Drug Metab Dispos.* 2013, **41**(1), 40-49.
- KADIAN, N. – RAJU, KRS. – RASHID, M. – MALIK, MY. – TANEJA, I. – WAHAJUDDIN, M. Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry. *J Pharm Biomed Anal.* 2016, **126**, 83-97.
- KASSA, J. – KORABECNY, J. – SEPSOVA, V. – TUMOVA, M. The evaluation of prophylactic efficacy of newly developed reversible inhibitors of acetylcholinesterase in soman-poisoned mice - a comparison with commonly used pyridostigmine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014, **115**(6), 571-576.
- KAZA, M. - KARAŻNIEWICZ-ŁADA, M. – KOSICKA, K. – SIEMIĄTKOWSKA, A. – RUDZKI, P.J. Bioanalytical method validation: new FDA guidance vs. EMA guideline. Better or worse? *J Pharm Biomed Anal.* 2019, **165**, 381-385.
- KAZAKEVICH, Y. – LOBRUTTO, R. *HPLC for Pharmaceutical Scientists.* Willey, 2006, ISBN: 978-0-471-68162-5
- KHOJASTEH, S.C. - WONG, H. - HOP, C.E.C.A. *Drug metabolism and pharmacokinetics quick guide.* Springer Science, 2011. ISBN: 978-1-4419-5629-3
- KIM, M.H. - MAENG, H.J. - YU, K.H. - LEE, K.R. - TSURUO, T. - KIM, D.D. - SHIM, C.K. - CHUNG, S.J. Evidence of carrier-mediated transport in the penetration of donepezil into the rat brain, *J. Pharm. Sci.* 2010, **99**(3), 1548–1566.
- KOLA, I. The state of innovation in drug development. *Clin Pharmacol Ther.* 2008, **83**(2), 227-230.
- KOOL, J. – NIESSEN W.M.A. *Analyzing Biomolecular Interactions by Mass Spectrometry.* Wiley, 2015. ISBN: 978-3-527-33464-3
- KORABECNY, J. – DOLEZAL, R. – CABELOVA, P. – HOROVA, A. – HRUBA, E. – RICNY, J. – SEDLACEK, L. – NEPOVIMOVA, E. – SPILOVSKA, K. – ANDRS, M. – MUSILEK, K. – OPLETALOVA, V. – SEPSOVA, V. – RIPOVA, D. – KUČA, K. 7-MEOTA-donepezil like compounds as cholinesterase inhibitors:

Synthesis, pharmacological evaluation, molecular modeling and QSAR studies. *Eur J Med Chem.* 2014, **82**, 426-438.

LINCOVÁ, D. – HASSAN, F. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Galén, 2007. ISBN: 978-80-7262-373

LIPINSKI, C.A. – LOMBARDO, F. – DOMINY, B.W. – FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001, **46**(1–3), 3–26.

MEYERS, R.A. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation, Supplementary volumes S1-S3*. Chichester: Wiley, 2011. ISBN: 978-0-470-97333-2

MISIK, J. – KORABECNY, J. – NEPOVIMOVA, E. – CABELOVA, P. – KASSA, J. The effects of novel 7-MEOTA-donepezil like hybrids and N-alkylated tacrine analogues in the treatment of quinuclidinyl benzilate-induced behavioural deficits in rats performing the multiple T-maze test. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015, **159**(4), 547-553.

MOEIN, M.M. - EL BEQQALI, A. - ABDEL-REHIM, M. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017, **1043**, 3-11.

MORPHY, R. - KAY, C. - RANKOVIC, Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov. Today.* 2004, **9**(15), 641-651.

OLSEN JV, D.E. – GODOY, L.M. - LI, G. – MACEK, B. – MORTENSEN, P. – PESCH, R. – MAKAROV, A. – LANGE, O. – HORNING, S. – MANN, M. Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics.* 2005, **4**(12), 2010-2021.

PAJOUHESH, H. – LENZ, G.R. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRx.* 2005, **2**(4), 541-553.

PATINY, L. - BOREL, A. ChemCalc: A building block for tomorrow's chemical infrastructure. *J Chem Inf Model.* 2013, **53**(5), 1223-1228.

PATOCKA, J. - BIELAVSKY, J. - FUSEK, J. Advances in synthesis of tacrine derivatives as potential-drugs for treatment of Alzheimer's disease, *Homeost. Health Dis.* 1994, **35**, 299-301.

PERRY, R.H. – COOKS, R.G. – NOLL, R.J. Orbitrap mass spectrometry: instrumentation, ion motion and applications. *Mass Spectrom Rev.* 2008, **27**(6), 661-699.

PFAUNMILLER, E.L. – PAULEMOND, M.L. – DUPPER, C.M. – HAGE, D.S. Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. *Anal Bioanal Chem.* 2013, **405**(7), 2133-2145.

POPE, C.N. – BRIMIJOIN, S. Cholinesterases and the fine line between poison and remedy. *Biochem Pharmacol.* 2018, **153**, 205-216.

REISBERG, B. – DOODY, R. – STÖFFLER, A. – SCHMITT, F. – FERRIS, S. – MÖBIUS, H.J. MEMANTINE STUDY GROUP. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2003, **348**(14), 1333-1341.

ROGERS, S.L. – FRIEDHOFF, L.T. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US Multicentre, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. The Donepezil Study Group. *Dementia.* 1996, **7**(6), 293-303.



- RÖSLER, M. – ANAND, R. – CICIN-SAIN, A. – GAUTHIER, S. – AGID, Y. – DAL-BIANCO, P. – STÄHELIN, H.B. – HARTMAN, R. – GHARABAWI, M. Efficacy and safety of rivastigmine in patients with Alzheimer's disease: international randomised controlled trial. *BMJ*. 1999, **318**(7184), 633-638.
- SATO, T. – HOSOKAWA, M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. *Chem Biol Interact*. 2006, **162**(3), 195-211.
- SCARPINI E. – SCHELTENS, P. – FELDMAN, H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol*. 2003, **2**(9), 539-547.
- SEPSOVA, V. – KARASOVA, J.Z. – TOBIN, G. – JUN, D. – KORABECNY, J. – CABELOVA, P. – JANSKA, K. – KRUSEK, J. – SKRENKOVA, K. – KUCA, K. – SOUKUP, O. Cholinergic properties of new 7-methoxytacrine-donepezil derivatives. *Gen Physiol Biophys*. 2015, **34**(2), 189-200.
- SMITH, D.A. – BEAMOUNT, K. – MAURER, T.S. – DI, L. Volume of Distribution in Drug Design. *J Med Chem*. 2015, **58**(15), 5691-5698.
- SOUKUP, O. – JUN, D. – ZDAROVA-KARASOVA, J. – PATOCKA, J. – MUSILEK, K. – KORABECNY, J. – KRUSEK, J. – KANIAKOVA, M. – SEPSOVA, V. – MANDIKOVA, J. – TREJTAR, F. – POHANKA, M. – DRTINOVA, L. – PAVLIK, M. – TOBIN, G. – KUCA, K. A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine. *Curr Alzheimer Res*. 2013, **10**(8), 893-906.
- SWARTZ, M. HPLC detectors: a brief review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol*. 2010, **33**, 1130-1150.
- TAKADA-TAKATORI, Y. – KUME, T. – SUGIMOTO, M. – KATSUKI, H. – SUGIMOTO, H. – AKAIK, A. Acetylcholinesterase inhibitors used in treatment of Alzheimer's disease prevent glutamate neurotoxicity via nicotinic acetylcholine receptors and phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Neuropharmacology*. 2006, **51**(3), 474–486.
- TARIOT, P.N. – FARLOW M.R. – GROSSBERG, G.T. – GRAHAM, S.M. – MCDONALD, S. – GERGEL, I. MEMANTINE STUDY GROUP. Memantine treatment in patients with moderate to severe Alzheimer disease already receiving donepezil: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004, **291**(3), 317-324.
- TARIOT, P.N. – SOLOMON P.R. – MORRIS, J.C. – KERSHAW, P. – LILIENFELD, S. – DING, C. A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine USA-10 Study Group. *Neurology*. 2000, **54**(12), 2269-2276.
- WHO – World Health Organization [online]. © 2019 WHO [cit. 27.12.2018] Dementia Fact Sheet. Dostupné z <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- ZUBAREV, R.A. – MAKAROV, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2013, **85**, 5288–5296

## 8 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

### 8.1 SEZNAM PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

#### Příloha č. 1 disertační práce:

**MZIK, M.** – KORABECNY, J. – NEPOVIMOVA, E. – VOŘÍŠEK, V. – PALIČKA, V. – KUČA, K. – ZDAROVA KARASOVA, J. An HPLC-MS method for the quantification of new acetylcholinesterase inhibitor PC 48 (7-MEOTA-donepezil like compound) in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016, **1020**, 85-89. **IF<sub>2016</sub> = 2,603**

#### Příloha č. 2 disertační práce:

ZDAROVA KARASOVA, J. – **MZIK, M.** – HROCH, M. – KORABECNY, J. – NEPOVIMOVA, E. – VORISEK, V. – PALIČKA, V. – KUČA, K. The New Acetylcholinesterase Inhibitors PC-37 and PC-48 (7-Methoxytacrine-Donepezil-Like Compounds): Characterization of Their Metabolites in Human Liver Microsomes, Pharmacokinetics and In Vivo Formation of the Major Metabolites in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2018, **122**(4), 373-382. **IF<sub>2018</sub> = 2,452**

#### Příloha č. 3 disertační práce:

ZDAROVA KARASOVA, J. – SESTAK, V. – KORABECNY, J. – MEZEIOVA, E. – PALIČKA, V. – KUČA, K. – **MZIK, M.** 1-Benzyl-4-methylpiperidinyl moiety in donepezil: The priority ticket across the blood-brain-barrier in rats. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018, **1092**, 350-358. **IF<sub>2018</sub> = 2,813**

#### Příloha č. 4 disertační práce:

CHALUPOVA, K. – KORABECNY, J. – BARTOLINI, M. – MONTI, B. – LAMBA, D. – CALIANDRO, R. – PESARESI, A. – BRAZZOLOTTO, X. – GASTELLIER, A.J. – NACHON, F. – PEJCHAL, J. – JAROSOVA, M. – HEPNAROVA, V. – JUN, D. – HRABINOVA, M. – DOLEZAL, R. – ZDAROVA KARASOVA, J. – **MZIK, M.** – KRISTOFIKOVA, Z. – MISIK, J. – MUCKOVA, L. – JOST, P. – SOUKUP, O. – BENKOVA, M. – SETNICKA, V. – HABARTOVA, L. – CHVOJKOVA, M. – KLETECKOVA, L. – VALES, K. – MEZEIOVA, E. – ULIASSI, E. – VALIS, M. – NEPOVIMOVA, E. – BOLOGNESI, M.L. – KUČA, K. Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. *Eur J Med Chem.* 2019, **168**, 491-514. **IF<sub>2018</sub> = 4,833**

#### Příloha č. 5 disertační práce:

**MZIK, M.** – KARASOVA ZDAROVA, J. – CHALUPOVA, K. – KORABECNY, J. – PALIČKA, V. – SESTAK, V. UHPLC-HRMS study of Anti-Alzheimer's drug candidates: metabolism of 7-MEOTA-tryptophan hybrids hampers their passage into brain. *J Pharm Biomed Anal.* 2019, **174**, 134-144. **IF<sub>2018</sub> = 2,983**

## 8.2 SEZNAM PUBLIKACÍ NEZAHNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

**MŽIK, M.** – CHMELAROVA, M. – JOHN, S. – LACO, J. – SLABY, O. – KISS, I. – BOHOVICOVA, L. – PALICKA, V. – NEKVINDOVA, J. Aberrant methylation of tumour suppressor genes WT1, GATA5 and PAX5 in hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med.* 2016, **54**(12), 1971-1980.

**IF<sub>2016</sub> = 3,432**

CHMELAŘOVÁ, M. – SIRÁK, I. – **MŽIK, M.** – SIEGLOVÁ, K. – VOŠMIKOVÁ, H. – DUNDR, P. – NĚMEJCOVÁ, K. – MICHÁLEK, J. – VOŠMIK, M. – PALIČKA, V. – LACO, J. Importance of Tumour Suppressor Gene Methylation in Sinonasal Carcinomas. *Folia Biol (Praha).* 2016, **62**(3), 110-119.

**IF<sub>2016</sub> = 0,939**

FEKETE, S. – SIMKO, J. – **MŽIK, M.** – KARESOVA, I. – ZIVNA, H. – ZIVNY, P. – PAVLIKOVÁ, L. – PALICKA, V. Negative effect of serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor therapy on rat bone tissue after orchidectomy. *Eur J Pharmacol.* 2015, **761**, 65-69.

**IF<sub>2015</sub> = 2,730**

FEKETE, S. – SIMKO, J. – **MŽIK, M.** – KARESOVA, I. – ZIVNA, H. – PAVLÍKOVÁ, L. – PALICKA, V. Effect of mirtazapine on rat bone tissue after orchidectomy. *Pharmacology.* 2015, **95**(3-4), 166-72.

**IF<sub>2015</sub> = 1,533**

CHMELAŘOVÁ, M. – DVOŘÁKOVÁ, E. – ŠPAČEK, J. – LACO, J. – **MŽIK, M.** – PALIČKA, V. Promoter methylation of GATA4, WIF1, NTRK1 and other selected tumour suppressor genes in ovarian cancer. *Folia Biol (Praha).* 2013, **59**(2), 87-92.

**IF<sub>2013</sub> = 1,167**

## 8.3 PLAKÁTOVÁ SDĚLENÍ NA ODBORNÝCH SETKÁNÍCH

**MŽIK, M.** – SESTAK, V. – ZDAROVA-KARASOVA, J. – PAVLIKOVA, L. – PALICKA, V. 1-benzyl-4-methyl-piperidinyli: Key to trans-barrier transport of donepezil in rats? XXI. Symposium der GTFCh, Mosbach, 2019