UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Martin Mžik **2019**

Doktorský studijní program

Klinická biochemie

Bioanalytické hodnocení nových inhibitorů acetylcholinesteráz

Bioanalytical Evaluation of New Acetylcholinesterase Inhibitors

(soubor publikovaných prací doplněných komentářem)

Mgr. Martin Mžik

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., dr. h. c.

Školitel konzultant: pplk. doc. PharmDr. Jana Žďárová Karasová, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Prohlášení autora

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2019 **Martin Mžik**

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval svému školiteli prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., dr. h. c. za odborné vedení, rady, cenné připomínky, a především za podporu, kterou mi poskytl v období nepříznivých časů doktorského studia. Mé velké poděkování patří i školiteli konzultantovi pplk. doc. PharmDr. Janě Žďárové Karasové, Ph.D., která mi dala příležitost společně pracovat na tomto výzkumném tématu. Jsem velmi rád, že naše spolupráce bude pokračovat i v následujících letech.

Můj vděk patří i mým kolegům z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky. Zvláště kolegyním z „318“ za vytvoření přátelského pracovního prostředí, ale také přednostce ústavu MUDr. Ladislavě Pavlíkové, která mě podporovala v odborném růstu. Zvláštní poděkování náleží mému kamarádovi, kolegovi a parťákovi PharmDr. Vítku Šestákovi, Ph.D., kterému děkuji za podporu v řešení výzkumných projektů, ale také za cenné rady a připomínky při sepisování této disertační práce.

V neposlední řadě bych rád poděkoval svojí snoubence Terezce za … za vše!

Práce byla finančně podpořena projektem **MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906)**, granty **SVV-260398** a **SVV-260181**, programem **PRVOUK P37/11** a programem **Progress Q40/01**.

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.

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.

Seznam použitých zkratek

7-MEOTA	7-methoxytakrin
ACN	acetonitril
AD	Alzheimerova demence
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AChEI	inhibitory acetylcholinesterázy
AK	aminokyselina
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
API	ionizace za atmosférického tlaku
APP	prekurzorový protein amyloidu beta
Aβ	amyloid beta
BECE-1	enzym β-sekretáza
BChE	butyrylcholinesteráza
BChEI	inhibitory butyrylcholinesterázy
C18	oktadecyl
C8	oktyl
CAD	Corona charged Aerosol Detector
CAS	katalytické aktivní místo
CDK	cyklin-dependentní kináza
CNS	centrální nervový systém
CT	počítačová tomografie
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
EMA	European Medicines Agency
ESI	ionizace elektrosprejem
FAD	familiární forma Alzheimerovy demence
FDA	Food and Drug Administration
Full-MS	sken celého spektra
HEB	hematoencefalická bariéra
HESI	ionizace vyhřívaným elektrosprejem
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hup	huperzin
ChAT	cholinacetyltransferáza
IS	vnitřní standard
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LIT	lineární iontová past
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny

LLOQ	dolní limit kvantifikace
LOD	limit detekce
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MAO	monoaminooxidáza
MCI	mírné kognitivní poruchy
ME	matricové efekty
MeOH	metanol
MMT	multi-medikační terapie
MRI	magnetická rezonance
MTBE	metyl tert-butyl éter
MTDL	„multi-target-directed ligands“
MW	molekulová hmotnost
N	počet teoretických pater
NMDA	N-methyl-D-aspartátový receptor
PAS	periferní aniontové místo
PET	pozitronová emisní tomografie
PFP	pentafluorofenyl
PP	srážení proteinů
Q	kvadrupól
QQQ	trojitý kvadrupól
R	rozlišení
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAD	sporadická forma Alzheimerovy demence
SERT	transportéry serotoninu
SIM	monitorování jednoho iontu
SPE	extrakce na tuhou fázi
SRM	záznam zvolených iontových reakcí
SSRI	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ULOQ	horní limit kvantifikace

OBSAH

1 ÚVOD 11
2 CÍLE PRÁCE 13
3 TEORETICKÁ ČÁST 14
3.1 Alzheimerova demence 14
3.1.1 Epidemiologie AD 14
3.1.2 Diagnostika AD 15
3.1.3 Neuropatologie AD 16
3.1.4 Cholinesterázy 20
3.1.5 Terapie AD 22
3.2 Současná strategie v léčbě AD 23
3.2.1 Takrin 24
3.2.2 Donepezil 24
3.2.3 Rivastigmin 25
3.2.4 Galantamin 26
3.2.5 Memantin 26
3.2.6 Huperzin A a B 27
3.3 Nové strategie v léčbě AD 29
3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 34
3.4.1 Charakteristiky chromatografického procesu 37
3.4.2 Instrumentace HPLC 38
3.4.3 Chromatografické kolony 39
3.4.4 Detektory 42
3.5 Hmotnostní spektrometrie 46
3.5.1 Ionizační zdroj 46
3.5.2 Hmotnostní analyzátory 50
3.5.3 Detektory 55
3.5.4 Skenovací módy 55
3.6 Úprava biologických vzorků před analýzou 57
3.7 Validace bioanalytické metody 59
3.7.1 Selektivita (Selectivity) 60
3.7.2 Přenos analytů (Carry-Over) 60
3.7.3 Spodní limit kvantifikace (LLOQ, Lower Limit of Quantification) 60
3.7.4 Kalibrační křivka (Calibration curve) 60

3.7.5 Přesnost (Accuracy) 61
3.7.6 Preciznost (Precision) 61
3.7.7 Diluční integrita (Dilution integrity) 61
3.7.8 Matricové efekty (ME, Matrix effect) 61
3.7.9 Stabilita (Stability) 62
3.7.10 Výtěžnost (Recovery) 63
3.8 Farmakokinetika a metabolismus 64
3.8.1 Kompartmentová metoda 66
3.8.2 Nekompartmentová metoda 68
3.8.3 Absorpce, Distribuce, Metabolismus a Eliminace 69
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACÍM 71
4.1 Analytická metoda pro stanovení PC-37 a PC-48 v plazmě, hodnocení farmakokinetického profilu a metabolizace 71
4.1.1 Cíl práce 72
4.1.2 Komentář k publikované práci 73
4.1.3 Dosažení cílů 81
4.2 Analytická metoda pro stanovení donepezilu a jeho tří fragmentů v plazmě a mozku, hodnocení farmakokinetického profilu 82
4.2.1 Cíl práce 83
4.2.2 Komentář k publikované práci 83
4.2.3 Dosažení cílů 89
4.3 Analytická metoda pro stanovení S-K1025 a S-K1026 v plazmě a mozku potkanů, hodnocení farmakokinetického profilu a metabolizace 90
4.3.1 Cíl práce 91
4.3.2 Komentář k publikované práci 91
4.3.3 Dosažení cílů 99
5 ZÁVĚR 100
6 SEZNAM PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI 102
7 LITERATURA 104
8 PŘÍLOHY 122
8.1 Příloha č. 1 123
8.2 Příloha č. 2 129
8.3 Příloha č. 3 143
8.4 Příloha č. 4 153
8.5 Příloha č. 5 178

1 ÚVOD

Alzheimerova demence (AD) je neurodegenerativní onemocnění mozku vedoucí k progresivní ztrátě paměti a vyšších kognitivních funkcí. S prevalencí 1 % v populaci se jedná o nejčastěji se vyskytující demenci s velmi krátkou dobou přežití. V současnosti není dostupná efektivní léčba, která by dokázala zvrátit průběh tohoto onemocnění, dostupná léčiva pouze zmírňuji příznaky. Proto se řada vědeckých skupin po celém světě věnuje studiu příčin a mechanismům rozvoje AD pro nalezení účinné prevence a léčby. Hlavním cílem v terapii je získat nová léčiva, která by rozvoj nemoci zvrátila nebo alespoň zastavila. Jednou z nadějných, a dnes intenzivně studovaných skupin látek, jsou duální inhibitory acetylcholinesteráz, které jsou schopné, mimo vlastní enzymové inhibiční aktivity, inhibovat i agregaci amyloidu beta.

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 studií. 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 velmi 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, tkáně, žluč atd.) a nízkým koncentracím testovaných látek, může být vývoj bioanalytické metody

určitou výzvou. 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 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) a core-shell technologií, které významně zrychlily a zlepšily účinnost separace látek. Dalším významnou technologií je hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, reprezentována především systémem Orbitrap nebo analyzátory 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.

Předložená disertační práce se v teoretické části zabývá úvodem do problematiky Alzheimerovy demence. Ve stručnosti popisuje patofyziologii onemocnění, současný způsob a nové strategie léčby se zaměřením především na inhibitory acetylcholinesterázy. Následující kapitoly jsou věnovány tématům, která se bezprostředně týkají vlastní experimentální práce – kapalinové chromatografii, hmotnostní spektrometrii, úpravě biologických vzorků, validaci metod a farmakokinetice. Experimentální část disertační práce je tvořena komentářem k pěti vědeckým pracím publikovaným v zahraničních časopisech s impakt faktorem. Tři práce se zabývají bioanalýzou čtyř nových inhibitorů acetylcholinesteráz a popisem jejich chování v organismu na základě stanovených farmakokinetických parametrů. Jedna práce se zabývá syntézou a biologickým/bioanalytickým hodnocením nové skupiny potenciálních léčiv odvozených od 7-methoxytakrinu a tryptofanu. Pátá práce je zaměřena na identifikaci části molekuly donepezilu zodpovědnou za aktivní transport léčiva přes hematoencefalickou bariéru.

2 CÍLE PRÁCE

Předkládaná 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 mozkovém 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 jsme v průběhu práce formulovali 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 mozkovém homogenátu potkana.
- **II.** Aplikace vyvinuté bioanalytické metody do hodnocení farmakokinetiky a objasnění vztahu struktura-přestup do mozku.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 ALZHEIMEROVA DEMENCE

Když Alois Alzheimer před více než sto lety léčil svoji pacientku Augustu Deterovou, neuvědomil si, že popsal jedno z nejvíce komplexních a složitých onemocnění v lidské historii. Jedná se o onemocnění, které je, i přes soustředěné úsilí vědců, výzkumných týmů a neurologů po celém světě, stále nevyléčitelné. Vhodná a včasně nasazená terapie dokáže průběh nemoci jenom zmírnit. A to i proto, že patofyziologie Alzheimerovy demence (AD) nebyla stále zcela objasněna.

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 stanovení diagnózy (***Ganguli, M. et al 2005***).

3.1.1 Epidemiologie AD

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 nízko 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 miliónů. Jen v Evropě dojde k nárůstu ze současných 10 na 19 milionů.

V České republice dnes žije s některou formou demence více než 156 tis. lidí, z toho 51 tis. mužů a 105 tis. žen. Ve věkové skupině mezi 80 a 85 lety je projevem onemocnění postiženo více než 10 % populace. Předpokládá se, že v roce 2050 bude v České republice přibližně 383 tis. obyvatel trpět demencí (***Mátl, O. et al, 2016***). Při pohledu na historický vývoj výskytu demence v České republice je patrné, že i zde počet lidí s diagnostikovanou

AD neustále narůstá. V šedesátých letech žilo v České republice odhadem 49-55 tis. demencí postižených lidí, v roce 1989 to bylo přibližně 73-81 tis. lidí, v roce 2000 asi 89-98 tis. (odhadované počty se liší v závislosti na použitých prevalenčních studiích). Péče o takto nemocné klade nemalé nároky na veřejné i soukromé rozpočty. Celkové náklady (včetně neformálních) na řešení problémů spojených s demencí jsou v ČR odhadovány v průměru na 1,25 % HDP (***Mátl, O. et al, 2016***).

3.1.2 Diagnostika AD

Alzheimerova choroba je obvykle diagnostikována na základě anamnestických údajů, klinického a laboratorního vyšetření. V roce 2011 byla publikována nová diagnostická kritéria, opírající se o nejnovější diagnostické metody a laboratorní analýzy, která diagnostiku AD posunují už do časných stádií nemoci. Na základě patofyziologických a patologických změn, které začínají již několik desítek let před vznikem samotné demence, se rozlišují tři stádia AD (***Yaari R. et al, 2011***):

I. **Preklinické stádium** – v mozku jsou přítomny patologické známky AD, avšak bez subjektivních a objektivních příznaků. Diagnóza v tomto stádiu nemá bezprostřední terapeutickou implikaci. V diagnostice je klíčové využití biochemických markerů a funkčních zobrazovacích technik (***Sperling, R.A. et al, 2011***)

II. **Mírné kognitivní poruchy** (Mild Cognitive Impairment, MCI) – pacient s nově vzniklým déletrvajícím kognitivním deficitem na podkladě patologie AD, dosud však zcela soběstačný. Cca 15 % pacientů s MCI každoročně progreduje do demence, určitá část zůstává dlouhodobě stabilní, a jen malá část pacientů se může opět normalizovat.

III. **Demence** – pacient s nově vzniklým déletrvajícím kognitivním deficitem, vyvolaným vyvrcholením patologických procesů AD, způsobující ztížení denních aktivit. Terapeutické ovlivnění průběhu onemocnění je v tomto stádiu obtížné (***Vyhnálek, M. et al, 2012***).

Pro diagnostické účely AD jsou vedle kognitivních testů využívány především zobrazovací techniky a biochemické vyšetření mozkomíšního moku. Pomocí zobrazovacích metod (CT, MRI, PET) se u pacientů prokazuje atrofie mediálních temporálních struktur

(hipokampus, amygdala) s rozšířením komorového systému, snížený metabolismus v temporální a parietální kůře, nebo se testuje přítomnost amyloidních plaků pomocí značených protilátek. Biochemické vyšetření spočívá v analýze mozkomíšního moku – pro AD je charakteristická zvýšená hladina tau proteinu a fosforylovaného tau proteinu, a snížená hladina beta amyloidu$_{1-42}$. Tato metoda má přibližně 90% senzitivitu a specificitu (***Sperling, R.A. et al, 2011; Vyhnálek, M. et al, 2012***).

3.1.3 Neuropatologie AD

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 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.** tvorbu a extracelulární ukládání amyloidních plaků složených zejména z nerozpustného beta-amyloidu (Aβ) (***Castro, A. et al, 2006***), **II.** tvorbu intraneuronálních neurofibrilárních klubíček obsahujících nerozpustný tau protein (***Alonso, A.C. et al, 1996***), a **III.** selektivní zánik acetylcholinergních neuronů (***Cummings, J.L., 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 (***Scarpini, E. et al, 2003; Andersen, J.K. 2004***). Řada těchto mechanismů je úzce propojena. Např. v oblasti plaků vzniká sterilní zánět s aktivací mikrogliálních 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.

3.1.3.1 Amyloidní hypotéza

Amyloid beta (Aβ) je hlavní složkou senilních plaků. Jedná se o fibrilární polypeptid složený nejčastěji z 38-43 aminokyselin (AK), který vzniká proteolytickým štěpením Aβ prekurzorového proteinu (APP) typu I – membránového proteinu s dosud nejasnou funkcí (***Dyrks, T. et al, 1988***). APP je v extracelulární oblasti nejprve štěpen enzymem β-sekretázou (BECE-1) za vzniku krátkého N-terminálního fragmentu (sAPP-β) a membránově vázaného C-terminálního konce (APP CTF-β) tvořeného 99 AK. Transmembránový APP CTF-β je následně štěpen γ-sekretázou (atypický membránově vázaný proteázový komplex) za vzniku peptidu Aβ. Nejvíce zastoupená izoforma amyloidu beta s počtem 40 AK je $A\beta_{40}$, minoritně je tvořena izoforma $A\beta_{42}$, která však vykazuje mnohem větší míru agregace, proto se primárně nachází u pacientů s AD (***Jarret, J.T. et al, 1993***).

Existuje několik germinálních mutací v genech kódujících APP, γ-sekretázu nebo presenilin (transmembránová katalytická jednotka γ-sekretázy), které ve výsledku vedou ke zvýšené tvorbě $A\beta_{42}$ (***Tanzi, R.E. et al, 2005***). U jedinců se zděděnou autozomálně dominantní mutací dochází k rozvoji AD již v mladším věku – jedná se o familiární formu AD (FAD), která tvoří přibližně 10 % všech případů. Daleko častěji se však vyskytuje sporadická forma AD (SAD), která je spojena se sníženou „clearance" tohoto polypeptidu. Za degradaci Aβ je zodpovědná metaloproteáza neprilysin (***Iwata, N. et al, 2000***) a inzulinová proteáza (Insulin-degrading enzyme) (***Farris, W. et al, 2003***), jejichž dysfunkce vede k hromadění Aβ.

Akumulace Aβ 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. Pozornost je věnována i solubilním Aβ oligomerům vázajících se na buněčný prionový protein (***Selkoe, D.J. et al, 2016***), který následně přes NMDA receptory aktivuje kaskádu, která fosforyluje tau protein (***Um JW 2012***). Všechny tyto děje mají za následek narušení přenosu signálů mezi neurony,

jejich postupnou degradaci, zánik a v konečném důsledku rozvoj demence (***Wolfe, M.S., 2017***).

3.1.3.2 Tau hypotéza

Tau proteiny (zkratka pro tubulin-associated unit) je označení pro skupinu šesti příbuzných proteinů o různé délce, které vznikají díky alternativnímu splicingu (endogenní proces úpravy primární RNA) jediného genu (*MAPT* – microtubule-associated protein tau). Vyskytují se především v nervové tkáni v distálních částech axonu. Tau proteiny se váží na mikrotubuly a pomáhají jim ke stabilizaci a snadnější polymeraci (***Johnson, G.V. et al, 2004***).

Agregované tau proteiny ve formě neurofibrilárních klubek, typický nález u pacientů s AD, jsou hyperfosforylovány. Fosforylace tau proteinu je důležitá pro regulaci interakce s mikrotubuly – fosforylovaná forma se z této vazby snadněji uvolňuje. Avšak fosforylovaný tau protein není schopen vykonávat svoji fyziologickou funkci, a navíc má vyšší tendenci k agregaci, což vede k destabilizaci mikrotubulů. Hyperfosforylace je řízena aktivovaným enzymem GSK-3β (glykogen syntáza kináza 3β) za účasti enzymu CDK 5 (cyklin dependentní kináza 5) (***Wolfe, M.S., 2017***). Tento proces je fyziologicky spouštěn i solubilními oligomery Aβ (***Um, J.W. et al, 2012***).

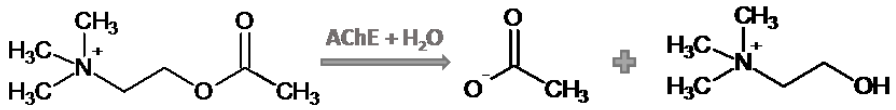
I když samotná ztráta stability mikrotubulů nevede k přímé neurodegeneraci, je vnímána jako sekundární potencující faktor primární příčiny, kterou je degenerace a agregace tau proteinů. Přítomnost neurofibrilárních klubek vykazuje lepší korelaci s neurodegenerativními projevy, ve srovnání s přítomností a množstvím senilních plaků (***Braak, H. et al, 1991***). Současné studie navíc předpokládají, že změněné formy tau proteinů se mohou šířit do ostatních neuronů prostřednictvím synapsí, a tím dochází k rychlejšímu a rozsáhlejšímu postižení neurální sítě – mechanismus připomíná šíření prionů (***Jucker, M. et al, 2013***).

3.1.3.3 Cholinergní hypotéza

Acetylcholin (ACh) je jediný neurotransmiter, který má chemickou strukturu kvarterní amoniové sloučeniny a jeho prekurzorem není žádná aminokyselina (***Picciotto, M.R. et al, 2012***). Je neurotransmiterem nervosvalových plotének, presynaptických neuronů v autonomním nervovém systému, stejně jako postgangliových neuronů

parasympatiku. V CNS moduluje celou řadu kortikálních aktivit, zejména bdění, spánek a konsolidaci paměťových stop (***Picciotto, M.R. et al, 2012***).

Acetylcholin (ACh) je ester cholinu a kyseliny octové. Syntetizuje se v jednom kroku – přenosem acetylu z acetyl-koenzymu A (AcCoA) na cholin, reakci katalyzuje cholinacetyltransferáza (ChAT, EC 2.3.1.6). Z axonu přicházející akční potenciál vyvolá depolarizaci presynaptické membrány a otevření Ca^{2+} kanálků. Následný influx iontů Ca^{2+} do buňky umožní uvolnění ve vezikulách uloženého ACh do synaptické štěrbiny, kde se následně váže na ACh receptory umístěné na postsynaptické membráně. Rozeznáváme dva typy ACh receptorů – muskarinové a nikotinové. Vazba na receptor (iontový kanálek) způsobí jeho velmi krátké otevření a průnik kationtů (Ca^{2+} a Na^{2+}) ze synaptické štěrbiny přes postsynaptickou membránu do dendritu, což umožní kontinuální šíření akčního potenciálu z neuronu na neuron. Ukončení cholinergní transmise zajišťují enzymy ze skupiny serinových hydroláz – dominantně acetylcholinesteráza (AChE, EC 3.1.1.7) a minoritně butyrylcholinesteráza (BChE, EC 3.1.1.8), které jsou vázány na postsynaptické membráně. Esterázy štěpí z receptorů uvolněný ACh na cholin a acetát. Cholin je zpětně transportován do presynaptického neuronu, kde může být využit k další syntéze (***Pope, C.N. et al, 2018***).



Acetylcholin **Acetát** **Cholin**

Cholinergní hypotéza, formulována v roce 1982 (***Bartus, R.T. et al, 1982***), je vůbec nejstarší a dodnes uznávanou teorií vysvětlující podstatu progrese AD. Tato hypotéza je založena na předpokladu, že pozorována ztráta cholinergní aktivity u AD pacientů potvrzuje úzký vztah mezi neuromediátorem ACh a schopností učení a paměti. Jedna z klinických studií prokázala, že částečná inhibice centrálního cholinergního systému u zdravých mladých dobrovolníků pomocí skopolaminu vedla k dočasnému rozvoji stejných symptomů jako u AD (***Drachman, D.A., 1977***). Cholinergní teorie byla dále podpořena histopatologickými studiemi mozku AD pacientů, u kterých byla prokázána spojitost mezi sníženou cholinergní aktivitou a nálezem senilních plaků a neurofibrilárních klubek. Později bylo prokázáno, že u pacientů s AD dochází k selektivnímu postižení cholinergních neuronů,

které se projikují z nucleus basalis Meynert do kůry mozkové a hipokampu, s následným významným snížením aktivity ChAT – enzymu zodpovědného za syntézu ACh (***Contestabile, A., 2011*****).** Pokud je tedy postižení paměťových funkcí považováno za primární indikátor AD, tak role cholinergního systému v kognitivních funkcích hraje klíčovou úlohu a tím opodstatňuje cholinergní hypotézu. Z těchto důvodů se stala snaha o zvýšení cholinergní aktivity u pacientů s AD (prostřednictvím inhibitorů AChE) základním paliativním léčebným přístupem.

3.1.4 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***).

AChE se ve vysokých koncentracích vyskytuje i na vnější membráně erytrocytů, kde je zodpovědná za degradaci plazmatického ACh (***Pope, C.N. et al, 2018***). Naproti tomu enzym BChE, jehož fyziologická funkce není stále objasněna, není pravděpodobně pro běžné fungování organismu nezbytně nutný – ať už knock-outované myši nebo deficientní jedinci nejevili žádné známky postižení (***Manoharan, I. et al, 2007***). BChE se nachází v řadě orgánů, dominantně v játrech, kde plní především detoxikační funkci. Ve zdravé mozkové tkáni je poměr aktivit AChE:BChE přibližně 4:1, avšak u pacientů s AD se aktivita AChE snižuje na polovinu, a naopak aktivita BChE se může zvýšit až dvojnásobně (***Furukawa-Hiby, Y. et al, 2011***).

Pro detailní pochopení celého mechanismu katalytického procesu je klíčová znalost 3D struktury AChE. 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. Následující popis vychází z práce autorů Dvir H. a kol. (***Dvir, H. et al, 2010***).

I. **Katalytické aktivní místo** (catalytic active site, CAS) – nachází se hluboko uvnitř enzymu a je složeno z katalytické triády Glutamát(202)-Serin(203)-Histidin(447) (zodpovědné za hydrolýzu ACh) a aniontového místa, které je

díky přítomnosti tryptofanu(86) zodpovědné za vazbu molekuly ACh a správnou orientaci prostřednictvím interakce s kvarterní amoniovou solí.

II. **Periferní aniontové místo** (peripheral anionic site, PAS) – umístěné na povrchu enzymu vedle zužujícího se vstupu do CAS, je zodpovědné za vazbu alosterických ligandů (především inhibitorů). Vazba ligandu na PAS může sféricky omezit vstup ACh do aktivního místa enzymu a zároveň může vyvolat drobnou konformační změnu enzymu s narušením prostorové konformace katalytické triády.

III. **Aromatické hrdlo** (Aromatic gorge) – dlouhá rovná trychtýřová dutina, která propojuje CAS a PAS. Je tvořena zbytky aromatických AK, průnik ACh je umožněn na základě kationtové π-interakce mezi kvarterní amoniovou solí a π-elektrony aromatických AK.

AChE existuje ve dvou odlišných formách (s identickým aktivním místem) – v globulární formě může být fyziologicky přítomen jako monomer (G_1), dimer (G_2) nebo tetramer (G_4), a v asymetrické formě (***Dvir, H. et al, 2010***). V mozku jsou nejvíce zastoupeny formy G_4 a G_1. Právě selektivní ztráta G_4 formy je typická pro AD, zatímco G_1 forma zůstává v průběhu rozvoje nemoci relativně zachována (***Rakonczay, Z., 2003***).

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 diferenciace, a co je z hlediska pochopení progrese AD nejdůležitější, hrají významnou roli v tvorbě Aβ plaků (***Pope, C.N. et al, 2018***). Cholinesterázy se konzistentně ukládají v amyloidních placích a prostřednictvím protein-proteinové interakce s Aβ akcelerují jejich ukládání a agregaci. I přesto, že je přesný mechanismus formování senilních plaků dosud nejasný, předpokládá se, že ChE fungují jako nukleační faktor, který usnadňuje a urychluje konverzi solubilních Aβ peptidů v nesolubilní amyloidní fibrily tím, že je konformačně pozmění (***Diamant, S. et al, 2006***). Krystalografické analýzy odhalily, že za interakci enzymu s Aβ 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 ACh tím, že se váží na CAS a zároveň vazbou na PAS redukovat interakci s Aβ peptidy.

3.1.5 Terapie AD

V současné době jsou v klinické praxi pouze dvě skupiny léčiv, které vedou ke zpomalení progrese demence a oddálení jejích těžkých stadií. První skupinu reprezentují tzv. kognitiva – centrálně působící inhibitory mozkových acetyl- i butyrylcholin-esteráz. Tato léčiva zlepšují cholinergní transmisi 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 (***Rosler, 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 zvyšuje tendenci k apoptóze. 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.

3.2 SOUČASNÁ STRATEGIE V LÉČBĚ AD

Šedesátá až osmdesátá léta dvacátého století jsou považována za zlatý věk výzkumu neurotransmiterů. Během této doby byly objeveny a detailně popsány nejdůležitější neurotransmitery a jejich receptory, což vedlo k detailnějšímu pochopení specifických nervových spojení a funkcí mozku (***Hokfelt, T., 2009***). Ruku v ruce s těmito zjištěními a s později popsanou skutečností, že přítomnost neurálních plaků u pacientů s AD je v přímé spojitosti s alterovanou produkcí a uvolňováním ACh, byla vyslovena cholinergní hypotéza jako možná příčina vzniku a rozvoje AD. Objasnění těchto souvislostí otevřelo novou kapitolu farmakologického výzkumu léčby AD s cílem zvýšit hladinu ACh v synapsích. Výzkum se zaměřoval na 5 základních mechanismů:

I. Inhibice AChE, snaha o zvýšení synaptické hladiny ACh blokováním enzymu AChE, který jej fyziologicky efektivně odbourává

II. Prekurzory ACh jako fosfatidylcholin, snaha o zvýšení biodostupnosti cholinu

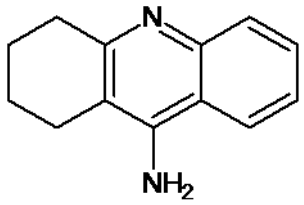
III. Uvolňování ACh z presynaptických prostor do synapsí

IV. Aktivace muskarinových receptorů na postsynaptické membráně

V. Aktivace nikotinových receptorů na postsynaptické membráně

Úspěch zaznamenala pouze prvně jmenovaná strategie a do klinické praxe bylo uvedeno několik nových léčiv. Jednalo se o látky takrin (Cognex®), donepezil (Aricept®), rivastigmin (Exelon®) a galantamin (Reminyl®) (***Corbett, A. et al, 2012***). Jedinou látkou, schválenou pro léčbu AD, která nespadá do skupiny inhibitorů AChE je memantin (Namenda™). Pro všechny současně dostupné preparáty platí, že nejsou schopny AD vyléčit ani trvale zamezit progresi onemocnění. Pouze zpomalují průběh choroby a oddalují vznik těžkých stadií (***Sabbagh, M.N. et al, 2008; Atta-Ur-Rahman et al, 2015***). V současnosti je ve třetí fázi klinického hodnocení (zahájeno v roce 2017) pouze jediné nové léčivo ze skupiny inhibitorů AChE (***Cummings, J. et al, 2018***).

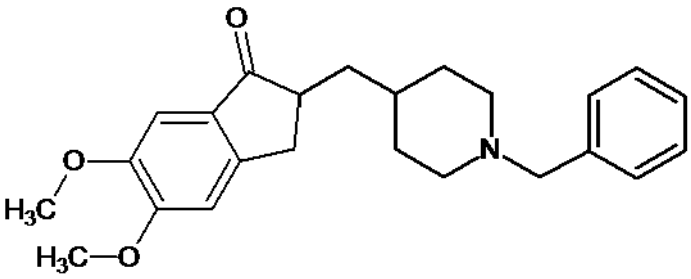
3.2.1 Takrin



Takrin (1,2,3,4-tetrahydroakridin-9-amine) byl původně vyvinut jako antimikrobiální agens před více než 60 lety. Jeho reverzibilní inhibiční účinky na AChE a BChE byly objeveny až v roce 1961 (***Heilbronn, E., 1961***), do klinické praxe byl zaveden v roce 1993, kdy byl často používán v kombinaci s lecitinem (***Eagger, S.A. et al, 1991***). Krystalografické studie prokázaly, že se takrin váže na katalytickou jednotku AChE, navíc je schopen vazby i na muskarinové a nikotinové receptory. Vazba na muskarinový M1 receptor zvyšuje uvolňování ACh a tím zvyšuje jeho koncentraci v synaptické štěrbině. Schopnost takrinu inhibovat zpětné vychytávání dopaminu a serotoninu v nervových zakončeních přispívá k antidepresivnímu efektu (***Harel, M. et al, 1993***).

Vzhledem k relativně rychlému biologickému poločasu (6 h) byl takrin, ve srovnání s ostatními preparáty, dávkován daleko častěji. Navíc musely být u pacientů průběžně monitorovány jaterní funkce (***Knapp, M.J. et al, 1994***). V současnosti se takrin již nepoužívá. V roce 2013 byl stažen z klinické praxe především pro častý výskyt vážné hepatotoxicity (až u třetiny pacientů), postižení gastrointenstinálního traktu a pro úzký terapeutický index (***Gracon, S.I. et al, 1998***). Navíc takrin inhiboval cytochrom P450 1A2, který je důležitý pro metabolismus řady běžně používaných léků.

3.2.2 Donepezil

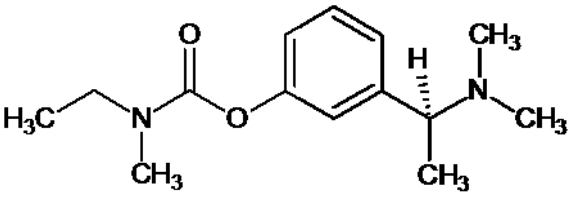


Donepezil ((RS)-2-[(1-benzyl-4-piperidyl)methyl]-5,6-dimethoxy-2,3-dihydroinden-1-one) se řadí mezi druhou generaci nekompetitivních inhibitorů AChE. Výzkum této látky začal již v roce 1983, do klinické praxe byl uveden o třináct let později v roce 1997. V současnosti se jedná o vůbec nejpoužívanější preparát v léčbě AD. Používá se buď samostatně nebo v kombinaci s memantinem pro léčbu lehké až středně těžké demence. Jeho dlouhý biologický poločas (70 h) umožňuje dávkování 1x za den, plazmatická koncentrace dosáhne steady-statu do tří měsíců (***Jelic, V. et al, 2010***). Je

bezpečný a dobře tolerovaný i staršími pacienty s komorbiditami a s polypragmazií (***Jackson, S. et al, 2004***).

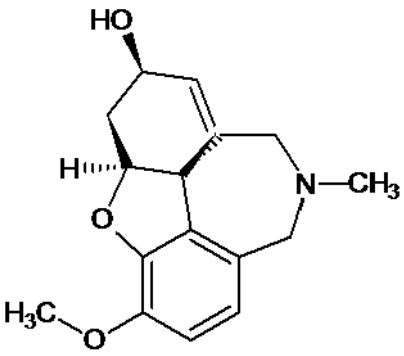
Donepezil není pouze selektivní inhibitor AChE, ale také je schopen zlepšovat symptomy nemoci, které vznikají na základě neurotoxického působení Aβ tím, že proniká do kortikálních neuronů, kde narušuje jeho tvorbu (***Beach, T.G. et al, 2000***). Navíc zvyšuje expresi nikotinových receptorů v mozkové kůře a redukuje koncentraci glutamátu, čímž částečně zabraňuje progresi AD. U donepezilu byly prokázány i významné antioxidační účinky (***Tayeb, H.O. et al, 2012***).

3.2.3 Rivastigmin



Rivastigmin ((S)-3-[1-(dimethylamino)ethyl]phenyl-N-ethyl-N-methylcarbamate) je střednědobě působící reverzibilní nekompetitivní inhibitor ChE, který byl na trh uveden v roce 1997. Někdy je označován jako pseudo-ireverzibilní inhibitor, protože navzdory svému krátkému biologickému poločasu (2 h) způsobuje dlouhodobou inhibici cholinesteráz (až 10 h) – tato vlastnost vychází z karbamátové struktury. Používá se pro léčbu středního až těžkého stupně AD. Ve srovnání s ostatními selektivními inhibitory AChE, je rivastigmin schopen inhibovat oba typy cholinesteráz (v poměru AChE:BChE = 1,3:1), což je velmi výhodné právě u těžších stádií AD, kdy dochází k postupnému úbytku enzymu AChE a jeho funkčnímu nahrazování BChE (***Ballard, C.G., 2002***). Rivastigmin je obecně dobře tolerován, nežádoucí účinky postihující gastrointestinální trakt (nauzea, zvracení) se mohou vyskytovat krátkodobě během titrace dávky. U transdermální formy (náplast) se tyto nežádoucí účinky neobjevují (***Khoury, R. et al, 2018***).

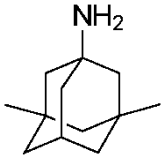
3.2.4 Galantamin



Galantamin ((4aS,6R,8aS)-5,6,9,10,11,12-hexahydro-3-methoxy-11-methyl-4aH-[1]-benzofuro-[3a,3,2-ef][2]benzazepin-6-ol) je přírodní alkaloid z některých druhů narcisů a sněženek. Jedná se o reverzibilní kompetitivní inhibitor AChE s výrazně menší afinitou k BChE (poměr AChE:BChE = 54:1), který byl zaveden do klinické praxe v roce 2001 (***Ago, Y. et al, 2011***). Kromě inhibiční aktivity vůči AChE se galantamin také váže na alosterické místo nikotinových receptorů (***Maelicke, A. et al, 2000***). To vede k jejich konformační změně s následným zvýšením citlivosti vůči ACh. Presynaptická modulace nikotinových receptorů hraje důležitou roli nejen v uvolňování ACh, ale také u dalších neurotransmiterů jako je γ-aminomáselná kyselina, glutamát, serotonin a noradrenalin. Všechny tyto neurotransmitery jsou důležité pro správnou funkci paměti, ovlivňují náladu a emoce. Patologicky zvýšená hladina glutamátu nepříznivě ovlivňuje schopnost učení a paměť, zatímco patologicky snížená koncentrace serotoninu vede k emociální nestabilitě (řada pacientů s AD trpí depresí). Z výše uvedených důvodů je galantamin preferovaným preparátem v léčbě AD (***Hu, N.W. et al, 2012***).

I přes klinické hodnocení různých způsobů podání, klinicky schválena je pouze perorální forma. Biodostupnost se pohybuje v rozmezí 85-100 %, jeho větší distribuční objem je způsoben akumulací v tkáních. Podobně jako ostatní inhibitory cholinesteráz má také nežádoucí účinky na gastrointestinální trakt (***Prvulovic, D. et al, 2010***).

3.2.5 Memantin

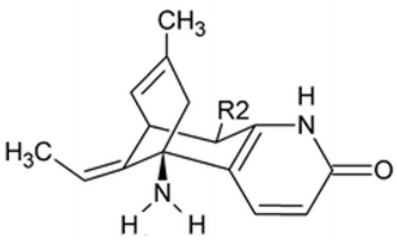


Memantin (3,5-dimethyladamantan-1-amine), na trhu od roku 2003, je nekompetitivní antagonista NMDA receptoru. NMDA receptor spadá do třídy ionotropních receptorů, tj. iontových kanálků, které po navázání ligandů (glutamátu a glycinu) umožní influx Ca^{2+} iontů do buňky s následným spuštěním řady signálních kaskád. Za fyziologických podmínek je doba otevření receptoru několik milisekund, což je optimum pro správnou excitaci buňky. Vyšší hladiny glutamátu, který je hůře odbouráván/recyklován u AD (***Wang, R. et al, 2017***), vedou

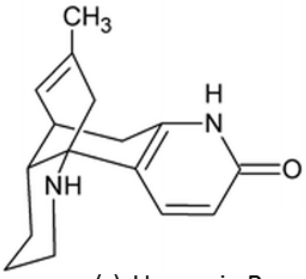
k prodloužení doby otevření kanálků a tím k hyperexcitaci a následnému poškození buňky. Memantin je schopen selektivně blokovat patologickou hyperaktivaci receptoru, ale přitom zachovat jeho fyziologickou funkci. Jeho mechanismus působení lze označit za neuroprotektivní, a díky svým vlastnostem, tj. nekompetitivní antagonista napěťově závislého NMDA receptoru se střední afinitou a rychlou „on-off" kinetikou, se stal rutinně využívaným léčivem. (***Lipton, S.A., 2006; Alam, S. et al, 2017; Wang, R. et al, 2017***)

Memantin se jako jediný z dostupných léků používá k léčbě střední až závažné AD, ale také se uplatňuje v léčbě vaskulární demence a v současnosti je klinicky testován i pro léčbu Parkinsonovy nemoci, epilepsie nebo schizofrenie (***Alam, S. et al, 2017***). Jedná se bezpečné léčivo s dlouhým biologickým poločasem (60-80 h) a velkým distribučním objemem (V_d = 9-11 L/kg). Od roku 2014 je s výhodou využívaná kombinace memantinu a donepezilu (NAMZARIC®) v léčbě všech stádií AD.

3.2.6 Huperzin A a B



(-)-Huperzin A



(-)-Huperzin B

Huperzin A a Huperzin B (Hup A, Hup B) jsou alkaloidy izolované z rostliny *Huperzia serrata*. Hup A je silný, selektivní, reverzibilní inhibitor AChE. Hup B je méně účinný a má nižší selektivitu vůči AChE, ale ve srovnání s Hup A má vyšší terapeutický index a dalšími pozitivní vlastnosti. V USA se Hup A používá jako doplněk stravy pro zlepšení paměti, a v Číně byl dokonce schválen pro symptomatickou léčbu lehkého až středního stupně AD (***Wang, B.S. et al, 2009***). V USA i Evropě proběhlo klinické hodnocení Hup A, nicméně i přes výsledky některých studií, které uváděly zlepšení kognitivních funkcí a klinického obrazu AD pacientů, se preparát nedostal do klinické praxe (***Yang, G. et al, 2013***). Jeden z hlavních důvodů byla metodologická nejednotnost v hodnocení kognitivních funkcí, vysoká heterogenita pacientů zahrnutých ve studiích a nedostatek informací o toxicitě a nežádoucích účincích (***Xing, S.H. et al, 2014***). Další studie prokázaly, že Hup A má protektivní efekt na neurony – zabraňuje jejich oxidativnímu poškození způsobenému amyloidem beta, antagonizuje NMDA receptor

a redukuje akumulaci železa v neuronech (***Qian, Z.M. et al, 2014***). Z těchto důvodů je Hup A využíván v syntéze nových analogů jako potencionálních léčiv AD.

3.3 NOVÉ STRATEGIE V LÉČBĚ AD

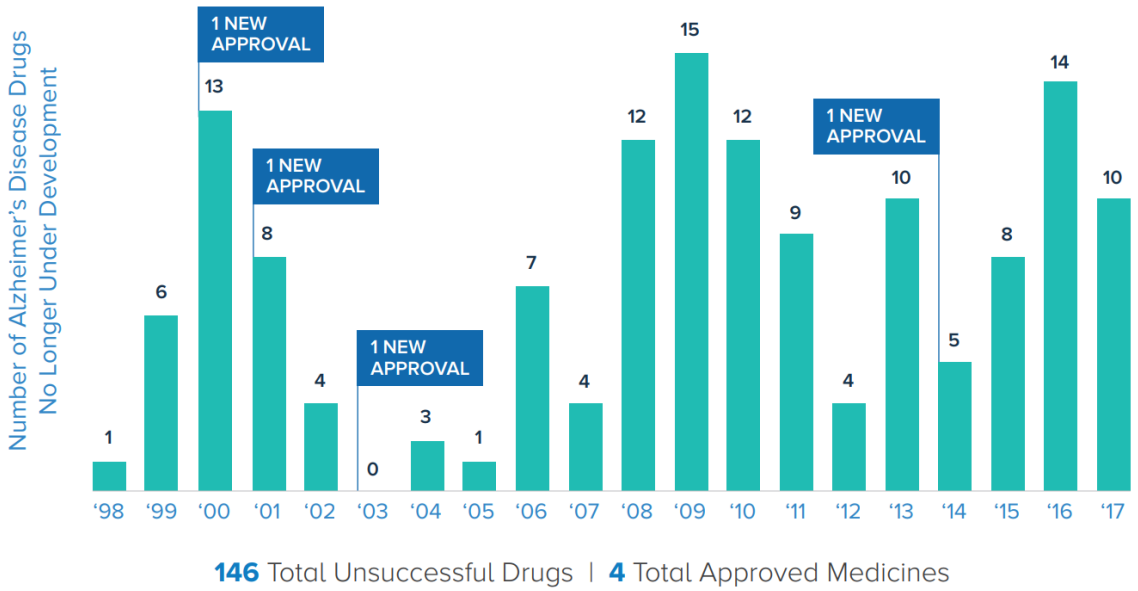
Ačkoliv cholinergní hypotéza byla velkým přínosem a definovala základy dnes dostupné paliativní léčby AD, v současnosti je na ní pohlíženo s určitým skepticizmem – podávání inhibitorů AChE nevede k uzdravení ani k zastavení progrese nemoci. Protože cholinergní hypotéza nedokázala vysvětlit základní příčinu 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). 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 Aβ prostřednictvím inhibice sekretáz, zvýšením clearance Aβ, nebo blokováním Aβ agregace. Nadějnými inhibitory sekretáz jsou experimentální látky s označením MK-8931, CNP520, E2609, které účinně snižují množství Aβ. V současnosti se nacházejí ve třetí fázi klinického hodnocení (***Cummings, J. et al, 2018***). Pro zabránění Aβ agregace se dále využívají i chelátory iontů kovů – Fe^{2+}, Cu^{2+} nebo Zn^{2+}, které jsou potřebné pro oligomerizaci a stabilizaci Aβ. Jeden z nejslibnějších přístupů je v současnosti považována imunoterapie. Vyvíjené protilátky jsou zacílené na ovlivnění produkce, agregace a depozice Aβ (***Lemere, C.A., 2009***). Využívá se jak pasivní imunoterapie (monoklonální protilátky nebo polyklonální imunoglobuliny proti Aβ), tak aktivní imunizace (Aβ peptid jako antigen) (***Hamaguchi, T. et al, 2006***). Velký potenciál tohoto přístupu se odráží ve skutečnosti, že ve třetí fázi klinického testování je v současnosti 9 preparátů (***Cummings, J. et al, 2018***).

II. **Tau protein terapie** – je zaměřena na cytoplazmatický tau protein, který je u AD abnormálně fosforylován s výslednou alterací axonálního transportu. Vyvíjeny jsou jak inhibitory kináz zodpovědné za hyperfosforylaci tau proteinu, tak preparáty inhibující tau agregaci a/nebo podporující rozložení vzniklých agregátů (***Ittner, L. et al, 2011***). V současnosti je ve třetí fázi klinického hodnocení pouze jediný zástupce z této skupiny – TRx0237, inhibitor agregace tau proteinu odvozený od metylenové modři (***Cummings, J. et al, 2018***).

III. **Terapie zaměřená na faktory související s neurálními plaky a uzlíky** – do této skupiny lze zařadit látky, které přímo nespadají do předcházejících dvou skupin, ale jedná se o farmakologicky velmi zajímavé cíle. Patří sem látky neuroprotektivní, antioxidanty, nesteroidní antiflogistika, monoaminooxidázy, statiny, SSRI (selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu), antihypertenziva, látky zaměřené na mitochondriální dysfunkci nebo na RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) (***Atta-Ur-Rahman et al, 2015***). 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. Na **Obr. 1** je graficky znázorněn počet neúspěšných kandidátů, v roce 2014 byl schválený preparát memantin/donepezil.



Obr. 1: Počet vyřazených kandidátních AD léčiv z klinického hodnocení v období 1998-2017

Zdroj: PhRMA analysis of Adis R&D Insight Database, 25 January 2018
Převzato z: http://phrma-docs.phrma.org/files/dmfile/AlzheimersSetbacksSteppingStones_FINAL_digital.pdf

Vývoj nových léčiv, u tak složitého onemocnění jako je AD, je velmi náročný. Jedná se o poruchu s komplexní patofyziologií, kterou lze těžko zvládnou 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 (MMT, koktejl dvou a více různých látek kombinujících různé terapeutické mechanismy a způsoby podání), přes multi-komponentní medikaci (MCM, 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 struktuře 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 těchto skupin:

I. **Inhibitory AChE (AChEI) s dvojitým vazebným místem (Dual binding site AChEI)** – AChE, mimo svou hlavní enzymatickou funkci, vykazují i neenzymatické vlastnosti. Ty spočívají především ve schopnosti interakce Aβ s PAS na povrchu enzymu, která usnadňuje Aβ agregaci (podrobněji viz kapitola 3.1.4). Tento přístup propojuje cholinergní a amyloidní hypotézu. Současným příkladem AChEI, schopných alespoň částečné inhibice agregace Aβ, je donepezil (snižuje agregaci Aβ 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 (***Munoz-Torrero, D. et al, 2006; Ismaili, L. et al, 2017***).

II. **Duální AChE a BACE-1 inhibitory** – inhibice enzymu BACE-1 vede ke zpomalení štěpení extracelulární domény APP a tím k výslednému snížení produkce solubilního Aβ. Duální AChE a BACE-1 inhibitory jsou schopné inhibovat agregaci Aβ dvěma odlišnými mechanismy – vazbou na PAS enzymu AChE, a inhibicí enzymu BACE-1. Syntéza nových potenciálních léčiv není v tomto případě jednoduchá. Molekula by měla mít vyvážené fyzikálně-chemické vlastnosti, aby byla schopna přestupovat přes hematoencefalickou bariéru (HEB), a zároveň by měla být dostatečně objemná, aby mohla efektivně blokovat aktivní místo BACE-1 enzymu. Bohužel většina slibných molekul se nedostala do III. fáze klinického hodnocení především z důvodu závažných nežádoucích účinků nebo nedostatečné efektivity v CNS (***Cao, J. et al, 2018***).

III. **Duální AChE-MAO inhibitory** – monoaminooxidázy (MAO) jsou enzymatickou rodinou, která během katalytické deaminace neurotransmiterů uvolňuje reaktivní formy kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species). Z tohoto důvodu inhibice MAO by měla redukovat oxidativní zátěž v mozkové tkáni. Byla navržena a syntetizována celá řada slibných molekul (***Cavalli, A. et al, 2008***). Např. ladostigil, vznikl spojením části molekuly rivastigminu a rasagilinu (***Bar-Am, O. et al, 2009***), byl slibným multifunkčním AChEI/MAO-AB inhibitorem, který se však nedostal do třetí fáze klinického hodnocení a v roce 2016 byl vyřazen z důvodu nedostatečné účinnosti ve srovnání s placebem (***Cao, J. et al, 2018***).

IV. **AChEI a blokátory Ca^{2+} kanálků** – přetížení buňky nadměrným množstvím Ca^{2+} je jeden z hlavních mechanismů způsobující poškození mitochondrií s následnou aktivací apoptotické kaskády zakončené buněčnou smrtí (***Cano-Abad, M.F. et al, 2001***). Dysfunkce homeostázy Ca^{2+} navíc akceleruje tvorbu Aβ a způsobuje hyperfosforylaci tau proteinu. Proto se modulace specifických Ca^{2+}

kanálků jeví jako efektivní strategií pro prevenci buněčného poškození a smrti (***Leon, R. et al, 2013***).

V. **AChEI a antioxidanty** – oxidační stres je jeden z hlavních příčin smrti neuronů u AD pacientů. Redukce oxidační zátěže je proto jeden ze slibných terapeutických přístupů. Proto byly například k molekule takrinu připojovány farmakofory s antioxidační aktivitou jako např. kyselina lipoová (***Rosini, M. et al, 2005***), kyselina ferulová (***Fang, L. et al, 2008***) nebo melatonin (***Rodriguez-Franco, M.I. et al, 2006***).

VI. **Duální AChE a SERT (transportéry serotoninu) inhibitory** – řada AD pacientů trpí depresí, které se daří zvládat pomocí inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). Avšak společná terapie SSRI s AChEI způsobuje řadu nežádoucích účinků v důsledku lékových interakcí. K překonání tohoto problému byly vyvíjeny molekuly s vyváženou inhibicí AChE a SERT, které měly zlepšovat kognitivní deficit (***Toda, N. et al, 2003; Toda, N. et al, 2010***). Nicméně nejslibnější kandidáti neuspěli v preklinických nebo klinických fázích hodnocení léčiv (***Cao, J. et al, 2018***).

3.4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je fyzikálně-chemická metoda schopná rozdělit jednotlivé složky ve velmi komplexním vzorku. Obecným principem této metody je separace analytů na základě jejich interakce se stacionární a kapalnou fázi. Stacionární fází je tuhá látka nebo kapalina, ukotvená na tuhém nosiči, zatímco mobilní fáze je výhradně tvořená kapalinou. Stacionární fáze je umístněná 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 následujících skupin (***Meyers, R.A. 2011)***.

I. **Chromatografie na normální fázi** – jedná se o adsorpční typ chromatografie, kde se jako stacionární fáze využívá relativně polární materiál (silikagel, oxid hlinitý) s nepolární mobilní fází (hexan, heptan). K separaci analytů dochází především na základě Van der Waalsových interakcí (dipól-dipól), které se řadí mezi interakce nejslabší, ale s ohledem na jejich obrovský počet mají značný vliv (***Butt, H.J. et al, 2006***). Mohou se zde uplatňovat samozřejmě i další interakce (hydrofobní interakce, vodíkové můstky). V tomto uspořádání se polární látky eluují později než látky nepolární

II. **Chromatografie na reverzní fázi** – v současnosti se jedná o vůbec nejrozšířenější mód chromatografické separace v bioanalýze nebo farmaceutické analýze. Separace je založena na rozdělování analytu mezi zakotvenou nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Jako mobilní fáze se používají směsi vodných pufrů s organickými rozpouštědly mísitelnými s vodou, především metanolem a acetonitrilem (v některých specifických případech isopropanolem nebo etanolem). Jako stacionární fáze se nejčastěji využívá silikagel s chemickou modifikací – oktadecyl (C18), oktyl (C8), bifenyl, fenylhexyl, pentafluorofenyl (PFP) a další. I když chromatografie na reverzních fázích je vůbec nejpoužívanější mód, přesný mechanismus retence je stále

předmětem debat (***Nikitas, P. et al, 2009***). Jedna z prvních teorií, která se snažila popsat chromatografickou retenci pomocí klasické termodynamiky, byla solvofóbní teorie (***Horváth, C. et al, 1976***). Ta vychází z předpokladu, že molekuly nepolárního analytu rozrušují intermolekulární interakce mezi molekulami vodné fáze, vzniká kavita s analytem umístěným uvnitř, který je následně z této fáze vypuzován pryč. Solvofóbní teorie byla však překonána, a dnes je upřednostňován retenční mechanismus vycházející z kombinace dvou modelů (***Jaroniec, M. et al, 1986)*** – rozdělovacího (partition model) a adsorpčního (adsorption model). Velmi zjednodušeně, rozdělovací model vychází z předpokladu, že stacionární i mobilní fáze jsou přirozeně tekuté a analyt se mezi ně distribuuje na základě rozdělovacího koeficientu. Alternativním přístupem je adsorpční model, podle kterého se analyt adsorbuje na povrch stacionární fáze (***Nikitas, P. et al, 2009)***.

III. **Iontově párová chromatografie** – jedná se o specifický typ chromatografie na reverzních fázích určený k separaci vysoce polárních sloučenin nebo sloučenin iontové povahy. Při chromatografii iontových párů se využívají dva mechanistické modely. První, kdy dochází k tvorbě iontových asociátů mezi separovanými látkami iontové povahy a opačně nabitým iontem, jehož molekula obsahuje relativně velký nepolární podíl, který interaguje s nepolární stacionární fází. Druhým mechanismem je dynamická iontová výměna mezi analyzovanými látkami iontové povahy s opačně nabitými částicemi protiontu, který je obsažen v mobilní fázi a váže se na povrch stacionární fáze (***Schill, G., 1989***). Jako iontových párů pro separaci bází se používají silné organické kyseliny nesoucí záporný náboj ze skupiny alkylsulfonátů nebo perfluorovaných karboxylových kyselin, které jsou těkavější, a proto kompatibilnější s MS detekcí. Jako protionty pro separaci kyselin slouží kvartérní amoniové soli nebo, v případě kompatibility s MS detekcí, těkavější látky ze skupiny dialkylammonium acetátů.

IV. **Iontově výměnná chromatografie** – využívá elektrostatické interakce mezi molekulou analytu a stacionární fází, která obsahuje kovalentně imobilizované funkční skupiny pro výměnu iontů. Podle povrchových funkčních skupin se stacionární fáze rozdělují na silný ($-SO_3^-$) a slabý katex ($-COO^-$), a silný ($-NR_3^+$)

a slabý anex ($-NH_3^+$). Jako mobilní fáze se užívají roztoky pufrů často v gradientovém uspořádaní, kdy během analýzy roste koncentrace soli v mobilní fázi nebo se mění její pH. Vysoký obsah málo těkavých solí v mobilní fázi je nekompatibilní s MS detekcí. (***Weiss, J. et al, 2003***)

V. **Hydrofobní interakční chromatografie** – tento mód se používá především k separaci proteinů a velkých peptidů v nativním stavu. Jedná se v podstatě o nadstavbu reverzní chromatografie, kde jsou používány méně hydrofobní stacionární fáze. Mobilní fáze jsou vodné, bez přídavku organických rozpouštědel, které způsobují denaturaci proteinů. K separaci proteinů je využívána gradientová eluce se snižující se iontovou sílou mobilní fáze (opak iontové chromatografie).

VI. **Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)** – široce využívaná pro separaci silně polárních látek, zejména sacharidů, aminokyselin, peptidů nebo přírodních látek a syntetických léčiv, jejichž retence je na systému reverzních fází velmi nízká i přes použití vodných mobilních fází s minimálním podílem organické složky (***Jandera, P., 2011***). K HILIC separaci lze použít různé typy stacionární fáze, která je tvořena buď samostatným silikagelem (případně jinými materiály na bázi ZrO_2, TiO_2) nebo chemicky modifikovaným silikagelem s polárními funkčními skupinami (amino, kyano, amid) (***Guo, Y. et al, 2005***). Mechanismem separace jsou hydrofilní proton donor-akceptorové a dipól-dipólové interakce jak s povrchem stacionární fáze, tak s difúzní vrstvou, která se vytváří na tomto povrchu (***Guo, Y., 2015***). Mobilní fáze je tvořena směsí vody, případně vodného pufru, s vysokým obsahem organické složky (50-90 %). S rostoucím obsahem organické složky roste retence polárních analytů. Díky vysokému obsahu těkavé organické složky je metoda kompatibilní i s hmotnostní spektrometrií (***Guo, Y., 2015***).

VII. **Vylučovací chromatografie** – v tomto uspořádání se látky dělí na základě jejich hydrodynamického objemu, tj. molekulové velikosti, s minimálním přispění chemických interakcí mezi analytem a stacionární fázi. Využití nalézá především v separaci makromolekul (proteiny, peptidy), objemné analyty jsou eluovány nejdříve, malé molekuly nejpozději (***Meyers, R.A. 2011)***.

3.4.1 Charakteristiky chromatografického procesu

Principem chromatografické separace je dělení složek vzorku mezi mobilní a stacionární fázi na základě výše popsaných interakcí. Při dělení dochází k opakovanému vytváření rovnovážných stavů separovaných látek mezi oběma fázemi. Tento proces jednotlivých komponent popisuje **distribuční konstanta**, která je vyjádřena jako poměr rovnovážných koncentrací určité složky v obou fázích. Za ideálních podmínek je distribuce symetrická, tj. chromatografický pík má Gaussovské rozložení. Každý pík, respektive látku, lze charakterizovat **retenčním časem** (t_R) – doba, která uplyne od nástřiku vzorku po dosažení maximální koncentrace. Obecně je cílem chromatografické separace rozdělení dvou analyzovaných látek do dvou samostatných píků. Stupeň rozdělení lze kvantitativně vyjádřit jako **rozlišení** (R_S), které je definováno jako poměr rozdílu retenčních časů dvou látek k součtu šířek píků v polovině jejich výšek. Rozlišení je bezrozměrná veličina, při hodnotě R_S=1,5 je překryv sousedních píků jen minimální (***Nováková, L. et al, 2013; Meyers, R.A. 2011***).

Proces chromatografické separace závisí na **separační účinnosti** kolony. Ta se vyjadřuje jako počet teoretických pater ***N*** na jednotku délky, který představuje počet hypoteticky vytvořených rovnovážných stavů separované látky mezi oběma fázemi. Pro tutéž kolonu je počet pater pro různé látky odlišný. S rostoucí délkou kolony se počet teoretických pater zvyšuje. Proto pro objektivní posouzení (nebo porovnání) separační účinnosti kolon se používá **výškový ekvivalent teoretického patra *H***, parametr, který vyjadřuje potřebnou délku kolony pro dosažení jednoho teoretického patra. Výškový ekvivalent teoretického patra v izokratických podmínkách je vypočítán pomocí van Deemterovy rovnice (***Deemter, J.J. et al, 1956; Gritti, F. et al, 2013***).

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{f(k) d_p^2 u}{D_M}$$

Van Deemterova rovnice se skládá ze třech částí A, B a C, které vyjadřují příspěvky k rozšiřování chromatografických zón, tj. separační účinnosti. První člen A popisuje **vířivou difúzi**, která není závislá na lineární rychlosti mobilní fáze ***u***. Tato difúze je ovlivněna

především velikostí (průměrem) částic d_p a kvalitou naplnění kolony λ. S klesající velikostí částic a s jejich rostoucí homogenitou se příspěvek vířivé difúze snižuje. Druhý člen B vyjadřuje **podélnou difúzi** analytu v mobilní fázi, tj. přesun analytu po koncentračním spádu do oblastí s nižší koncentrací. Člen B je charakterizován korekčním faktorem pro tvar póru částice γ, difúzním koeficientem analytu D_M a lineární průtokovou rychlostí u. Při běžně používaných průtocích je příspěvek podélné difúze zanedbatelný. Třetí člen C pak vyjadřuje **odpor proti přenosu hmoty** mezi mobilní a stacionární fází. Je ovlivněn retenčním faktorem analytu k, čtvercem průměru částice d_p^2, lineární průtokovou rychlostí u a je nepřímo úměrný difúznímu koeficientu analytu D_M. (***Nováková, L. et al, 2013; Meyers R.A. 2011; Gritti, F. et al, 2013***)

Z van Deemterovy rovnice vyplývá, že čím nižší výškový ekvivalent *H*, tím vyšší účinnost separace. Snížení parametru *H* lze docílit zmenšením velikosti částic a zvýšením jejich homogenity. Se zvyšováním lineární rychlosti mobilní fáze výškový ekvivalent *H* prudce klesá (pouze do určité hodnoty, kde pozvolna vzrůstá), nicméně tento vzestup je pro sub-2 µm částice zanedbatelný. S použitím takto malých částic lze zkrátit dobu analýzy navýšením rychlosti průtoku mobilní fáze bez snížení separační účinnosti kolony.

3.4.2 Instrumentace HPLC

Kapalinový chromatograf je složen z několika základních částí. **Zásobníky mobilní fáze** s obsahem různých složek o různé eluční síle. Zpravidla se jedná o skleněné nádoby opatřené uzávěrem z inertního plastu s otvory pro teflonové hadičky. Mobilní fáze je čerpána přes filtry odstraňující mechanické nečistoty. Následuje **degaser**, zařízení sloužící k odstranění plynů z mobilní fáze před jejím vstupem do chromatografické kolony. Přítomnost vzduchových bublin v chromatografickém systému způsobuje řadu problémů, které vedou ke snížení citlivost, separační účinnosti, a především opakovatelnosti separace. Nejčastěji jsou využívány membránové vakuové odplyňovače, kde mobilní fáze protéká přes semipermeabilní hadičku umístěnou ve vakuu. Většina moderních HPLC sestav degaser obsahuje, v opačném případě je nutné mobilní fázi odplynit pomocí ultrazvuku a/nebo probublávat pomocí hélia, které vytěsni rozpuštěné plyny. Další součástí systému je **směšovací zařízení**, které umožňuje efektivní promísení mobilní fáze přicházející ze dvou či více zásobníků mobilní fáze, a tím udržet její konstantní složení (isokratická eluce) nebo

složení automaticky měnit dle nastaveného schématu (gradientová eluce). Definovaný průtok mobilní fáze systémem je zajišťován **chromatografickou pumpou**. Ta musí udržet konstantní průtok s minimální fluktuací. Proto jsou obvykle využívány duální čerpadla s recipročním pumpováním, tj. zatímco se jedna část plní, druhá vytlačuje kapalinu do systému – výsledkem je téměř bezpulzní čerpání. Vysokotlaké pumpy pracují při tlacích do 400 bar (u UHPLC až do 1500 bar (***Fekete, S. et al, 2014 A***)). Za chromatografickou pumpou se nachází **dávkovací ventil**, který je v dnešní době integrální součástí termostatovaného **autosampleru**. Proces dávkování vzorku je plně automatizován. Vzorek se dávkuje injekční stříkačkou do nástřikové smyčky zapojené do vícecestného (většinou šesticestného) ventilu, který umožňuje dávkování bez přerušení toku mobilní fáze. Směs látek unášená mobilní fází se následně dostává na **analytickou kolonu**. Ta je zpravidla umístěna v **kolonovém termostatu**, který udržuje teplotu při separaci na nastavené hodnotě. Před samostatnou analytickou kolonou je většinou umístěna ještě **předkolona**, která chrání kolonu tím, že zachytává mechanické nečistoty a látky, které se ireverzibilně váží na kolonu. Zpravidla obsahuje stejnou stacionární fázi jako kolona. Chromatografická kolona umožňuje separaci jednotlivých složek vzorku na základě fyzikálně-chemických interakcí se stacionární a mobilní fází. Analyty separované do zón pak procházejí **detektorem**, který na základě měření fyzikálních veličin umožňuje jejich detekci. (***Nováková, L. et al, 2013; Meyers, R.A. 2011; Kazakevich, Y. et al, 2006***)

3.4.3 Chromatografické kolony

Chromatografická kolona je 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 (***Pfaunmiller, 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. Vůbec nejrozšířenějším materiálem je silikagel, který je využíván buď přímo jako polární stacionární fáze (na povrchu obsahuje volné silanolové skupiny), anebo se jeho povrch modifikuje jinými funkčními skupinami, které ovlivní výslednou selektivitu. 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***). Dalším materiálem mimo silikagel jsou polymery (***Faria, A.M. et al, 2009***), hybridní materiály tvořené siliko-ethylenovým kopolymerem (***Cheng, Y.F. et al, 2000***), oxid zirkoničitý nebo titaničitý (***Zhang, J. et al, 2017***) nebo porézní grafitový uhlík (***Liang, X.J., 2018***).

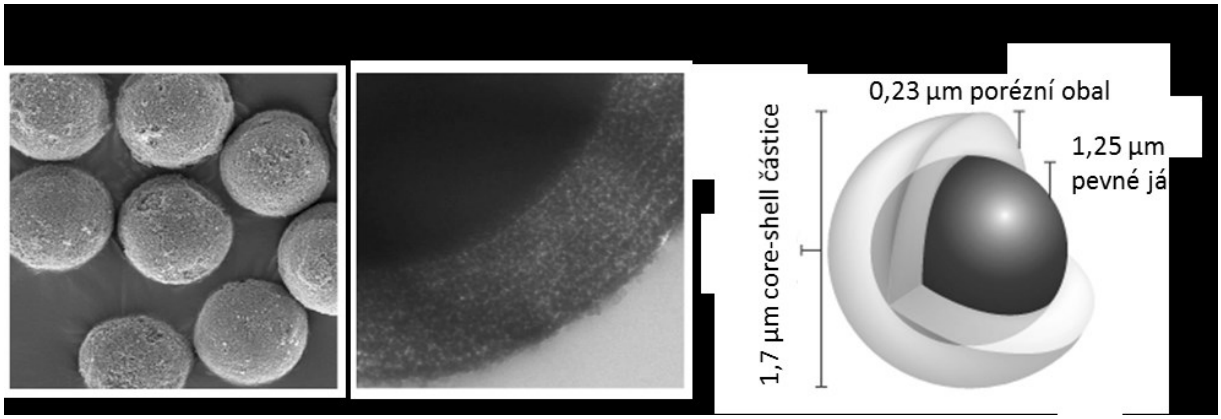
Mimo chemismus stacionární fáze lze chromatografickou kolonu popsat několika dalšími základními parametry (***Kazakevich, Y. et al, 2006***). **Délka kolony** (standardně 50-250 mm), s jejímž nárůstem stoupá účinnost separace, ale za cenu nárůstu zpětného tlaku. **Vnitřní průměr kolony** (standardně 2,1 – 4,6 mm) má vliv na velikost průtoku mobilní fáze, zmenšení průměru je spojeno s poklesem podélné difuze. **Velikost částic** (standardně 1,3 – 5,0 µm), parametr, který má zásadní vliv na účinnost chromatografické separace. Se zmenšujícím se průměrem částice roste celkový povrch sorbentu, snižuje se vířivá difúze a klesá i odpor proti přenosu hmoty. Tím se zvyšuje celková účinnost separace. Na druhou stranu, s klesající velikostí částic se zákonitě zmenšuje i intersticiální prostor, čímž dochází ke snížené propustnosti kolony a tím k vyššímu zpětnému tlaku (***Gritti, F. et al, 2013)***. Morfologie částic je také důležitá, protože ovlivňuje separační účinnost kolony a zpětný tlak. Snahou je vytvořit morfologicky stejné částice s „hladkým“ povrchem. S částicemi souvisí i **velikost pórů** (zpravidla 80-120 Å pro analýzu malých molekul), která ovlivňuje celkovou povrchovou plochu sorbentu. Ideální je uniformní velikost pórů s minimální přítomností mikropórů. Dalším parametrem je **stupeň pokrytí**, který charakterizuje množství chemicky vázané stacionární fáze, tj. v případě silikagelu počet modifikovaných silanolových skupin. Běžně se uvádí jako koncentrace vázané fáze na jednotku povrchu (µmol/m^2) (***Meyers, R.A. 2011***). Silikagelová chemicky vázaná stacionární fáze však obsahuje i zbytkové volné silanolové skupiny (-OH), které zhoršují účinnost chromatografické separace (především u bazických látek). Proto se v praxi běžně eliminují. K tomu lze využít proces označovaný jako endcapping – přístupné volné silanolové skupiny jsou modifikovány (***Pesek, J.J. et al, 2003***). Další možností je využití prostorového odstínění volných -OH skupin pomocí modifikovaného chemicky vázaného ligandu.

Zavedení stacionárních fází s velikostí částic menší než 2 µm, které byly uvedeny na trh již před patnácti lety, znamenalo zvýšení separační účinnosti a dramatické snížení času analýzy při zachování stejné selektivity a kapacity separace. Snížení velikosti částic však vedlo k markantnímu nárůstu zpětného tlaku na koloně potažmo v celém systému před

kolonou. Plné využití potenciálu sub-2 µm 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***). V dnešní době je UHPLC systém standardním vybavením většiny bioanalytických laboratoří. V budoucnosti pak můžeme očekávat další snižování velikosti částic pod 1,5 µm s vysokou morfologickou uniformitou. To bude spojeno s konstrukčním vylepšením UHPLC soustav, které budou schopné operovat při běžných pracovních tlacích nad 1 400 bar (***Fekete, S. et al, 2014 B***). Další možností, jak zefektivnit chromatografickou separaci je zvýšení teploty na koloně, která vede ke snížení viskozity mobilní fáze a tím ke snížení zpětného tlaku. V současnosti je limitující teplotní stabilita použité stacionární fáze, například limit 60℃ pro nejrozšířenější silikagelové kolony. Použitím modifikovaného silikagelu nebo jiných stacionárních fází lze dosáhnout výrazně vyšších separačních teplot (***Heinisch, S. et al, 2009; Fekete, S. et al, 2014 B***)

Jeden ze současných trendů ve vývoji chromatografických kolon (HPLC i UHPLC) je použití povrchově porézních tzv. **core-shell** (jiné označení fused-core) částic (***Hayes, R. et al, 2014***). 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 (**Obr. 2**). Jádro může být vyrobeno z různých typů materiálů, ať organických (polymery) nebo anorganických (uhlík, zlato, hliník) s obvyklým průměrem 0,9 – 3,7 µm. Obal jádra je tvořen několika vrstvami chemicky modifikovaného silikagelu s přesnou velikostí pórů. Volba materiálů a poměr jádra k obalu pak těmto částicím propůjčuje charakteristické vlastnosti (***Ghosh Chaudhuri, R. et al, 2012***). Pevné jádro neumožní analytům proniknout dovnitř. Ty se mohou dostat pouze do povrchových vrstev, díky čemuž snižuje odpor proti přenosu hmoty. To vše vede ke zvýšení účinnosti separace a lepšímu rozlišení. Ke zlepšení separační účinnost přispívá také uniformní velikost core-shell částic, která zmenšuje vířivou difúzi až o 40 % (***Ruta, J. et al, 2012***). Core-shell částice zvyšují permeabilitu kolony a umožňují použití vyšších průtoků za nižšího tlaku systému. Proto i na konvenčních HPLC systémech lze využít kolony o průměru sub-3µm částic se zvýšenou separační účinností. Pro HPLC systémy se standardně využívají částice o velikosti 5,0 a 2,7 µm, pro UHPLC systémy pak 1,7 a 1,3 µm.

Přehled core-shell technologií jednotlivých výrobců a porovnání jejich kolon je diskutováno v pracích Fekete et al (***Fekete, S. et al, 2011***) nebo Ali et al. (***Ali, I. et al, 2012***).



Obr. 2: Core-shell částice na záznamu z elektronového mikroskopu (A) a její grafické znázornění (B).
Zdroj A: https://www.chromacademy.com/Core-Shell-Particles.html?tpm=1_1
Zdroj B: https://www.chromservis.eu/i/core-shell-technology/c/stationary-phases-overview

3.4.4 Detektory

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. Mezi universální detektory se řadí i CAD (Charged Aerosol Detector) nebo ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), které jsou charakterizovány minimální závislostí odezvy detektoru na struktuře látky, širokým dynamickým rozsahem a citlivostí. (***Nováková, L. et al, 2013; Meyers, R.A. 2011***)

Obecné požadavky na detektory v kapalinové chromatografii jsou v podstatě podobné jiným instrumentálním technikám. Ideální detektor musí být robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty a mít konstrukčně malý vnitřní objem, aby nepřispíval k rozšiřování chromatografických zón. Signál detektoru by měl být stabilní, reprodukovatelný, lineárně závislý na koncentraci analytu s širokým dynamickým rozsahem. Specificita a citlivost detektoru by měla být co nejvyšší a detektor by měl být

schopen pracovat s vysokou frekvencí záznamu. Signál by měl mít co nejmenší šum a nedriftovat. Protože však neexistuje ideální detektor, který by splňoval všechny výše popsané nároky, je potřeba zvolit takový, který pro dané analytické účely bude nejvhodnější. Mezi běžné detektory využívané v HPLC/UHPLC patří spektrofotometrické, fluorescenční, hmotnostní, elektrochemické a další. (***Swartz, M. et al, 2010***)

3.4.4.1 UV-VIS detektor

UV-VIS detektor patří k vůbec nejpoužívanějším detektorům v HPLC, a to především z důvodů konstrukční jednoduchosti, provozní spolehlivosti a možnosti detekovat relativně velké množství látek. Detektor pracuje při vlnové délce 190-800 nm, a koncentrace vzorku se stanovuje z poklesu světelného toku při jeho průchodu skrz detekční celu. Výpočet pak vychází z Beerova zákona. Schopnost látek absorbovat fotony z UV nebo viditelné oblasti světla je dána jejich strukturou (chromoforem), přesněji schopností elektronů přejít z $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ nebo $n \rightarrow \sigma^*$ molekulových orbitalů. Většina aromatických sloučenin silně absorbuje ve vlnové délce 260 nm nebo nižší, sloučeniny s jednou až dvěma dvojnými vazbami při 215 nm a alifatické sloučeniny při 205 nm. Citlivost detektoru závisí na délce optické dráhy a zpravidla dosahuje hodnot 10^{-9} až 10^{-10} g/ml (***Swartz, M., 2010***).

Rozlišujeme tři základní typy UV-VIS detektorů. **I.** Detektory s fixní vlnovou délkou, které jsou přednastavené na měření pouze jedné vlnové délky (nejčastěji 254 nm) – v současnosti se používají jen velmi omezeně. **II.** Detektory s nastavitelnou vlnovou délkou, které využívají deuteriovou (pro UV oblast) a/nebo wolframovou lampu (pro VIS oblast) jako zdroj polychromatického záření, a pomocí monochromátorů se vybírá požadovaná vlnová dálka. **III.** Detektory s diodovým polem (PDA, DAD) zaznamenávají celé spektrum vlnových délek v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Je sestrojen z jednotlivých fotodiod, jejichž počet určuje spektrální rozlišení. Detektory s diodovým polem umožňují krom kvantitativního měření získat i informaci o UV-VIS spektru dané látky, tj. kvalitativní informaci k ověření její totožnosti nebo čistoty (***Swartz, M., 2010; Zhang, K. et al, 2019***).

3.4.4.2 Fluorescenční detektor

Fluorescenční (fluorimetrické) detektory jsou dalším běžným typem detektorů. Jsou založeny na principu fluorescence, kdy molekuly obsahující fluorofor, po absorpci primárního elektromagnetického záření, přecházejí ze základního do excitovaného stavu. Absorbovanou energii můžou molekuly vyzářit jako fluorescenci, tj. emisi sekundárního záření o větší vlnové délce, a tím se vrátit zpět do základního stavu. Výhodou fluorescenčního detektoru, ve srovnání s UV-VIS, je řádově vyšší citlivost a vyšší selektivita, nevýhodou pak menší lineární rozsah. Moderní fluorescenční detektory umožňují nastavit délku excitačního i emitovaného záření, kterou lze v průběhu analýzy měnit individuálně pro každou látku. (***Swartz, M., 2010; Meyers, R.A. 2011)***

3.4.4.3 Hmotnostní detektory

Hmotnostně-spektrometrický (hmotnostní) detektor není úplně správné označení, protože se primárně nejedná o přidruženou jednotku kapalinového chromatografu určenou k detekci látek. Jedná se o autonomní zařízení, které umožňuje separaci iontů v plynné fázi dle jejich hmotnosti a náboje. Proto je přesnější označení hmotnostní spektrometr. Hmotnostní spektrometrii je věnována samostatná kapitola.

3.4.4.4 Méně používané detektory

Elektrochemické detektory se používají k detekci látek, které jsou schopné elektrochemické reakce (oxidace, redukce) probíhající na fázovém rozhraní elektroda-mobilní fáze. Měří určitou elektrickou veličinu (potenciál, proud, kapacitu) vyvolanou průchodem látky přes detekční celu sestávající ze dvou nebo tří elektrod. Využívají se buď amperometrické nebo coulometrické detektory (***Swartz, M., 2010)***. Jejich výhodou je vysoká citlivost a rychlost odezvy, nicméně množství aplikací pro elektrochemickou detekci není příliš velké. **Vodivostní detektory** měří elektrickou vodivost eluátu v průtokové cele mezi dvěma elektrodami. Řadí se mezi univerzální detektory a nejvíce se uplatňují v iontové chromatografii. **Refraktometrický detektor** je další typ univerzálního detektoru, který měří změny indexu lomu eluátu v měřící cele. Používá se v gelové chromatografii v analýze cukrů, lipidů nebo polymerů. **Chemiluminiscenční dusíkový detektor** je prvkově specifický detektor pro analýzu sloučenin obsahující dusík. Mobilní fáze s eluenty je termicky

rozložena za vzniku excitovaného NO_2*, který emituje foton, jež je detekován. Existuje i chemiluminiscenční detektor specifický pro síru (***Swartz, M., 2010; Zhang, K. et al, 2019***).

Další skupinu universálních detektorů představují relativně mladší zařízení. **Evaporative Light Scattering Detector** (ELSD) slouží k detekci látek, které ve své molekule nemají zabudovaný chromofor nebo fluorofor (mastné kyseliny, fosfolipidy, sacharidy). Funguje na principu zmlžení (nebulizaci) mobilní fáze obsahující eluenty, s následným zahřátím kapiček a odpařením mobilní fáze. Vzniklé částečky pak rozptylují světelné záření, které je zaznamenáno fotodetektorem (***Magnusson, L.E. et al, 2015***). Modifikací ELSD vzniká Condensation nucleation light scattering detector (CNLSD). Po odpaření mobilní fáze vytvářejí vzniklé částečky kondenzační jádro, na kterých se sráží nosný plyn a tím zvětšuje jejich objem. Díky tomu je dosaženo až stonásobného zvýšení citlivosti (***Koropchak, J.A. et al, 1996***). **Corona charged Aerosol Detector** (CAD) pracuje na principu detekce kladně nabitých částic. Po nebulizaci mobilní fáze a vzniku kapiček dochází k jejímu odpaření za tvorby menších částic (***Dixon, R.W. et al, 2002***). Ty se následně střetávají se sekundárním proudem dusíku (nebo vzduchu), který je prostřednictvím vysokonapěťového koronárního výboje kladně nabitý. Kladně nabitý nosný plyn předává svůj náboj molekulám analytu, které jsou následně hnány přes iontovou past do kolektoru, kterému předávají svůj náboj za vzniku elektrického proudu. Generovaný signál je přímo úměrný množství analytu. Jedná se o univerzální a velmi citlivý detektor s vysokým dynamickým rozsahem, který je využíván v celé řadě analytických aplikací, včetně vývoje léčiv (***Magnusson, L.E. et al, 2015***). CAD ale neposkytuje spektrální informace jako UV nebo MS detektor, rozlišení jednotlivých analytů je pouze na základě retenčních časů.

3.5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická technika metoda sloužící k převedení molekul na ionty, separaci těchto iontů na základě jejich poměru hmotnosti a náboje (*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. V následujících kapitolách budou stručně popsány jednotlivé komponenty.

3.5.1 Ionizační zdroj

Ionizační zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na kladně nebo záporně nabité 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** – spadá zde 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** – 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

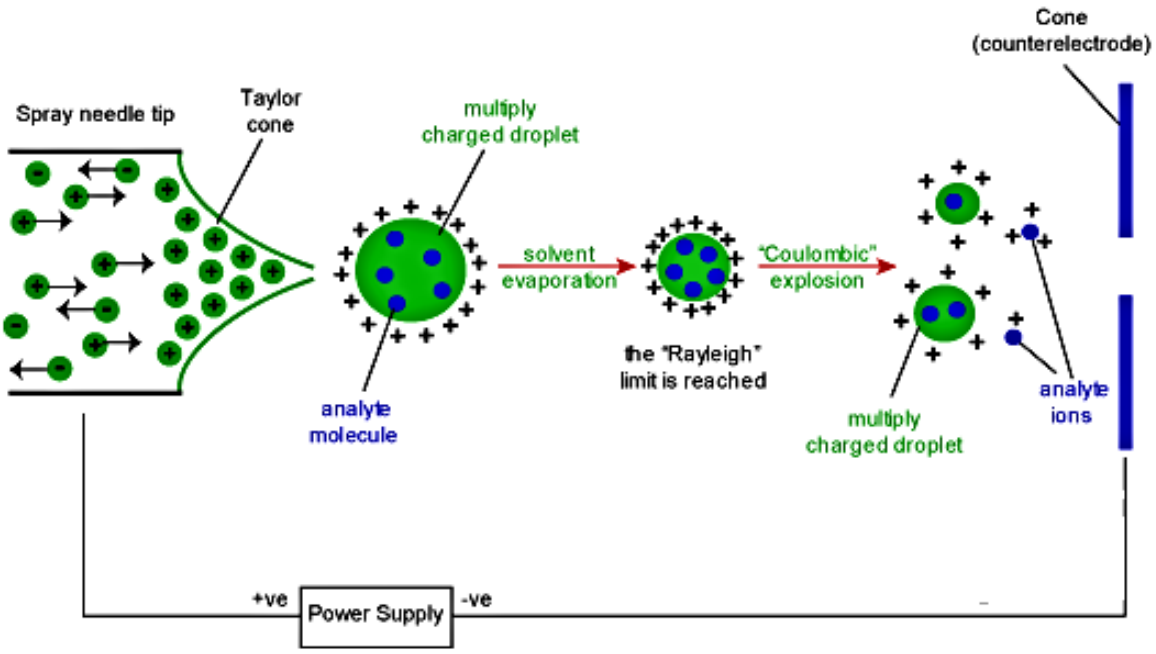
(ESI, Electrospray Ionization), chemickou ionizaci (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) a fotoionizaci (APPI, Atmospheric Pressure Photo Ionisation) (***Hoffmann, E.D. et al, 2007; Kazakevich, Y. et al, 2006)***.

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.

3.5.1.1 Ionizace elektrosprejem (ESI, Electrospray Ionization)

První popis ESI je datován rokem 1917, kdy česko-americký fyzik John Zeleny (***Zeleny, J., 1917***) popsal, jak vysoké elektrické napětí aplikované na konec kapiláry vedlo k rozpadu tekutiny na malé kapičky. Rozvoj této techniky v 70. a 80. letech vedl k prvním praktickým LC-MS aplikacím, a v současnosti se jedná o nejpoužívanější ionizační techniku v hmotnostně spektrometrické analýze středně polárních až polárních analytů se širokým rozsahem *m/z* (***Kazakevich, Y. et al, 2006***).

Mobilní fáze z kapalinového chromatografu je do iontového zdroje přiváděna kapilárou, na jejíž konec je aplikován kladný nebo záporný potenciál (3-6 kV). Zároveň je na konci kapiláry přiváděn dusík, který slouží k pneumatickému zmlžování mobilní fáze. Výsledkem je vznik aerosolu, který si na svém povrchu nese náboj. Postupným odpařováním rozpouštědla z povrchu kapiček se zmenšuje jejich průměr a tím roste velikost jejich povrchového náboje. Zmenšování probíhá až do dosažení Rayleighova stabilitního limitu (***Taflin, D.C. et al, 1989***) s následnou coulombickou explozí, která způsobí roztržení kapky na menší částice aerosolu. Tento krok se několikrát opakuje až do konečného vytvoření velmi malých a vysoce nabitých kapiček, ze kterých se ionty analytu vypudí elektrostatickou repulzí (***Wilm, M., 2011***). Proces je schematicky zobrazen na **Obr. 3**. V pozitivním módu nejčastěji vznikají molekulové ionty $[M+H]^+$, nebo adukty typu $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+NH_4]^+$ v závislosti na podmínkách ionizace nebo použité mobilní fázi. V případě negativního módu dochází nejčastěji ke ztrátě protonu za vzniku $[M-H]^-$, případně mohou vznikat adukty $[M+Cl]^-$ a $[M+CH_3COO]^-$. (***Hoffmann, E. et al, 2007***)



Obr. 3: Schématické zobrazení procesu tvorby kladných iontů u ESI
Zdroj: http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html

Ionizace pomocí elektrospreje je vhodná i pro analýzu vysokomolekulárních látek, například proteinů. Díky tvorbě vícenásobného náboje v makromolekule dochází ke snižování hodnoty *m/z*, a tím jsou tyto látky stanovitelné i na hmotnostních analyzátorech s omezeným hmotnostním rozsahem jako jsou kvadrupóly. Jednou z nevýhod použití ESI je vyšší riziko matricových efektů – stav, kdy koelující látky interferují s ionizací cílových analytů a tím účinnost ionizace snižují (suprese) nebo naopak zvyšují (enhancement). Za ME mohou být zodpovědné buď endogenní látky obsažené ve vzorku (fosfolipidy, proteiny, soli), nebo exogenní látky přítomné například v mobilní fázi (***Panuwet, P. et al, 2016***). Dalším omezením ESI je analýza vysoce koncentrovaných vzorků, kdy koeluované látky soupeří o náboj nebo o místo na povrchu kapičky, a tím si vzájemně snižují efektivitu ionizace (***Annesley, T.M., 2003***).

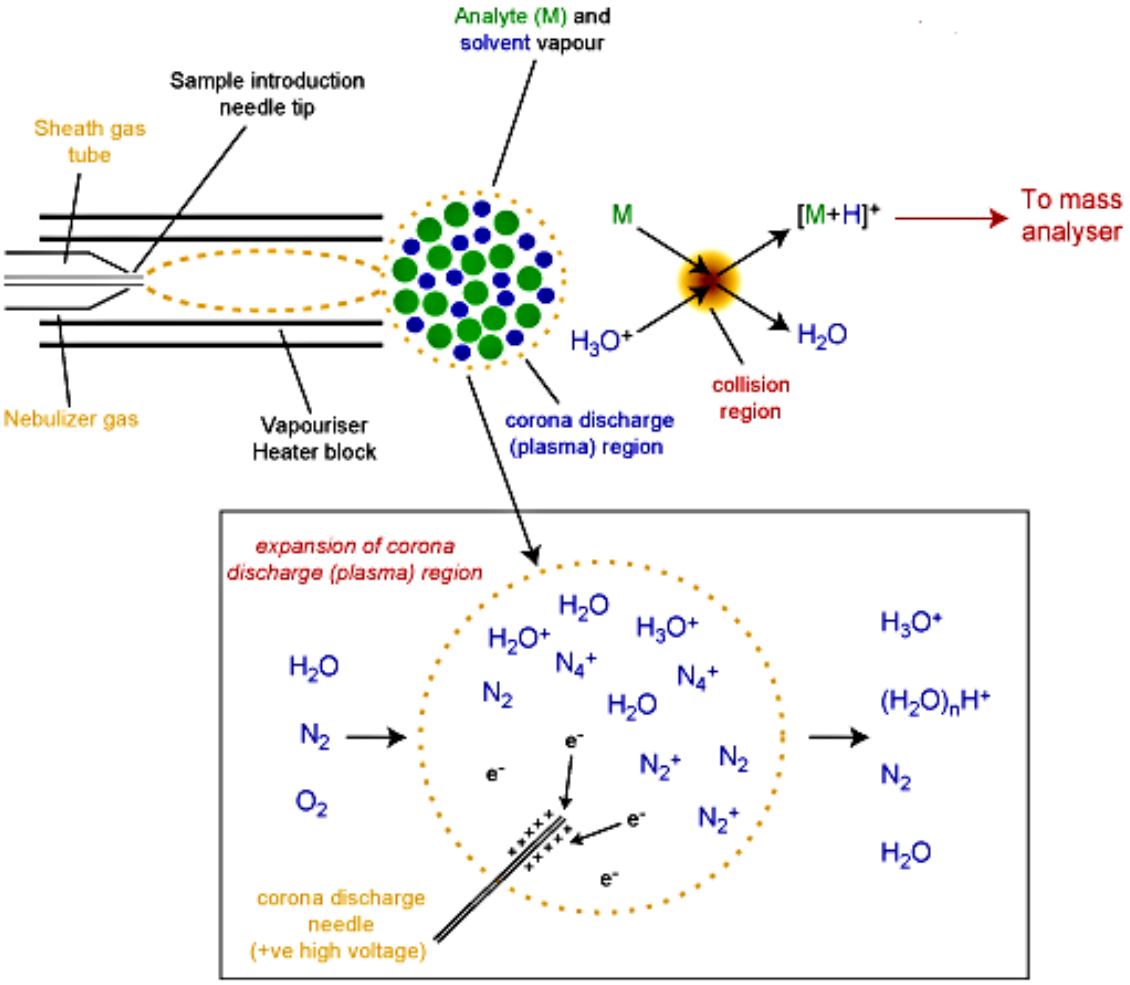
Jednou z používaných modifikací elektrospreje je **heated-electrospray ionization** (HESI), která funguje na podobném principu jako ESI. HESI je schopná ohřát proud pomocného plynu (auxiliary gas) až na teplotu 600 ℃. Zahřátý pomocný plyn umožňuje rychlejší odpařování kapiček, čímž zvyšuje ionizační efektivitu. To je spojeno se zvýšenou citlivostí hmotnostního spektrometru – ve srovnání s ESI až pětinásobně (***Lu, W. et al, 2008***).

Další modifikací je **Nano-electrospray ionization** (Nano-ESI), která využívá velmi nízkých průtoků (<1 000 nl/min) mobilní fáze. Pro zmlžení malých objemů se nepoužívá nebulizační plyn, k tvorbě aerosolu dochází na konci tenké kapiláry s vloženým napětím. Proto i mechanismus ionizace je odlišný – u Nano-ESI vznikají řádově menší kapičky ze kterých se vzápětí uvolňují ionty analytů. Efektivita ionizace dosahuje hodnot 50-60 % (***Karas, M. et al, 2000***). Použití této ionizační techniky je spojeno s významně nižší spotřebou rozpouštědel a vzorků, proto se uplatňuje například ve spojení s kapilární elektroforézou (***Stolz, A. et al, 2019***).

3.5.1.2 Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI, Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

APCI je druhá nejčastěji používaná ionizační technika pro spojení LC-MS. Řadí se mezi měkké ionizační techniky, ale ve srovnání s ESI je méně „šetrná" k parentním analytům – běžně jsou pozorovány fragmentové ionty. Využívá se především v analýze středně polárních až nepolárních analytů s molekulovou hmotnostní do 1 500 Da. Ve srovnání s ESI lze pomocí APCI dosáhnout efektivnější ionizace i při vyšších průtocích mobilní fáze (až 2 ml/min), a složky matrice mají na ionizaci menší vliv (***Souverian, S. et al, 2004***). Rozdíly mezi ESI a APCI jsou založeny především na odlišném ionizačním mechanismu. Zatímco u ESI jsou analyty ionizovány v kapalné fázi (v nabitých kapkách) a následně uvolněny do plynné fáze, u APCI jsou analyty nejdříve zplyněny v neutrální formě a až poté ionizovány prostřednictvím chemické reakce (***Award, H. et al, 2015***).

Ionizační mechanismus je zobrazen na **Obr. 4**. Mobilní fáze s analyty je nejprve zmlžena proudem dusíku za vzniku aerosolu, který následně prochází vytemperovanou trubicí (300-500 ℃), kde je kapalina postupně odpařována. Vysušený aerosol se poté dostává ke kovové jehle s vloženým vysokým napětím (3-4 kV) způsobující koronový výboj. Ten je hnacím mechanismem ionizace, která probíhá v několika krocích. Prvně dochází k ionizaci molekul dusíku, které náboj dále předávají molekulám vody (nebo jiným složkám mobilní fáze), v závislosti na polaritě vzniká oxoniový kation nebo hydroxidový anion s následným intramolekulárním přenosem náboje na molekuly analytu. Vzniklé ionty jsou $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$. (***Kazakevich, Y. et al, 2006; Award, H. et al, 2015***)



Obr. 4: Schématické zobrazení procesu tvorby kladných iontů u APCI
Zdroj: http://www.bris.ac.uk/nerclsmsf/techniques/hplcms.html

Příbuznou ionizační technikou je **fotoionizace za atmosférického tlaku** (APPI, Atmospheric Pressure Photoionization), která se využívá v daleko menší míře. APPI má stejné uspořádání jako APCI, jen pro ionizaci molekul se místo jehly využívá zdroj UV záření (kryptonová lampa). Ionizační technika je vhodná pro ionizaci menších molekul (do 2 kDa) s velmi nízkou polaritou (***Raffaelli, A. et al, 2003***). Při fotoionizaci vznikají primárně radikál-kationty $M^{\cdot+}$ tvořené vyražením elektronu z molekuly, nebo vznikají ionty $[M+H]^+$ při přenosu protonu na molekulu analytu.

3.5.2 Hmotnostní analyzátory

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 nabité částice. V bioanalýze se nejčastěji využívají kvadrupólové analyzátory, iontové pasti, analyzátory 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.

Základními parametry popisující hmotnostní analyzátory jsou rozlišení, správnost určení hodnoty m/z, lineární dynamický rozsah, hmotnostní rozsah a rychlost skenování (***Kool, J. et al, 2015; Hoffmann, E.D. et al, 2007***).

Dříve se před parametrem **rozlišení** využíval parametr **rozlišovací schopnost**, který byl definován jako schopnost analyzátoru rozlišit nejmenší možný rozdíl v hodnotách *m/z* mezi dvěma podobnými ionty o stejné intenzitě. V současnosti se používá novější definice **rozlišení *R***, která je vztažena k jednomu píku o konkrétní hodnotě *m/z* (***Brenton, A.G. et al, 2010***). Rozlišení se vypočítá ze vztahu:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

kde ***m*** je hmotnost iontu a ***⊿m*** je šířka píku v polovině jeho výšky. Rozlišení hmotnostních analyzátorů se standardně udává při hodnotě *m/z* 200 – to umožňuje jejich jednoduché porovnání. Například analyzátor rozlišením 70 000 je schopen od sebe bezpečně odlišit ionty o hodnotě *m/z* 200,0000 a 200,0029.

Správnost určení *m/z* je další z klíčových parametrů a vyjadřuje míru shody mezi teoretickou a experimentálně změřenou hodnotou *m/z* (***Brenton, A.G. et al, 2010***). Vyjadřuje se jako chyba měření v jednotkách ***ppm*** a lze jej odvodit z následujícího vztahu:

$$ppm = \frac{m_e - m_t}{m_t} \times 10^6$$

kde m_e je naměřená molekulová hmotnost a m_t je teoretická molekulová hmotnost dána součtem hmotností jednotlivých atomů v molekule. Analyzátory typu Orbitrap nebo FT-ICR jsou schopné pracovat s chybou měření do jednoho *ppm*.

Lineární dynamický rozsah udává rozmezí, v nichž je odezva detektoru lineárně závislá na koncentraci analytu. **Hmotnostní rozsah** udává rozsah hodnot *m/z*, se kterým analyzátor dokáže pracovat. **Rychlost skenování** vyjadřuje počet měřících cyklů za časovou jednotku (sekundu) – udává se v jednotkách Hz. (***Kool, J. et al, 2015; Hoffmann, E.D. et al, 2007***)

3.5.2.1 Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole, Q)

Kvadrupól patří mezi vůbec nejpoužívanější analyzátor v bioanalýze malých molekul. Sestává ze čtyřech stejných pravidelně uspořádaných kovových tyčí, na dvě protilehlé je vloženo kladné a na další dvě záporné stejnosměrné napětí, se superponovanou střídavou vysokofrekvenční složkou vloženou na všechny tyče. To vytváří elektromagnetické pole, které ovlivňuje dráhu procházejících iontů. Ion se dostává do středu osy kvadrupólu a při průchodu začíná oscilovat s určitou frekvencí a amplitudou. Pouze ionty s přesně daným poměrem hmotnosti a náboje se dokážou pohybovat po stabilní dráze skrz analyzátor. V opačném případě dojde ke kolizi s tyčí kvadrupólu a jejich zániku. (***Hoffmann, E.D. et al, 2007)***

Využití samostatného kvadrupólu je značně omezené, protože neumožňuje provedení MS^2 experimentu. Proto se využívají jako iontové filtry v kombinaci s dalšími analyzátory (TOF, Orbitrap) (***El-Aneed, A. et al, 2009***), anebo samostatně v tandemovém uspořádání tří kvadrupólů za sebou – analyzátor se označuje jako **trojitý kvadrupól** (QQQ). První a třetí Q slouží jako hmotnostní filtry, v prostředním dochází ke kolizi iontů s inertním plynem za vzniku fragmentů - slouží jako kolizní cela. Díky rychlosti měření, velkému dynamickému rozsahu a citlivosti jsou trojité kvadrupóly rutinně využívány nejen v kvantitativní analýze složitých směsí, ale také v metabolických studiích (***Spaggiari, D. et al, 2014***).

3.5.2.2 3D iontová past

Iontová past je v podstatě 3D uspořádáním kvadrupólu. Je tvořena dvěma koncovými hyperbolickými elektrodami a jednou kruhovou středovou elektrodou. Generované elektromagnetické pole pak umožní udržet ionty (v určitém rozsahu *m/z*) ve středu pasti. Stabilní pohyb iontů v pasti je podporován přítomností hélia, které jim

v důsledku srážek odebírá kinetickou energii. Postupnou změnou napětí jsou ionty vypuzovány podle jejich *m/z* směrem k detektoru. Konstrukce iontové pasti umožní provádět MS^n experimenty, které jsou potřebné v kvalitativní analýze. Nevýhodou je nízká účinnost záchytu iontů (5 %), a především nežádoucí tvorba prostorového náboje, která negativně ovlivňuje rozlišení, přesnost měření, citlivost a dynamický rozsah (***Paul, W., 1990***). Toto omezení částečně překonává tzv. **lineární iontová past** (LIT), která je více podobná kvadrupólu, avšak na obou koncích se nacházejí elektrody, které umožní prostorovou stabilizaci iontů (***Brancia, F.L., 2006***).

3.5.2.3 Analyzátor doby letu (TOF, Time Of Flight)

V tomto pulzním analyzátoru jsou generované ionty akcelerovány napěťovým pulzem do letové trubice s následným dopadem na detektor. Ionty letí různou rychlostí, která závisí na poměru jejich hmotnosti a náboje. Všechny ionty jsou na začátku akcelerovány stejnou kinetickou energií, proto ty menší dosáhnou vyšších rychlostí, tj. kratší doby letu. Princip TOF tedy spočívá v měření času (řádově nano až mikrosekundy), který potřebuje ion k překonání vzdálenosti od místa urychlení po detektor. Lineární uspořádání proto neposkytuje větší rozlišení (1-3 tis.). S využitím iontového zrcadla (reflektron), které je tvořeno soustavou prstencových elektrod s přivedeným napětím o stejné polaritě, se dosáhne 10x vyššího rozlišení (cca 25-40 tis). Ionty s větší kinetickou energií pronikají hlouběji do odrazového elektrického pole reflektronu, čímž dochází k jejich zpoždění oproti iontům lehčím. (***Boesl, U., 2017***)

3.5.2.4 Elektrostatická orbitální past (Orbitrap)

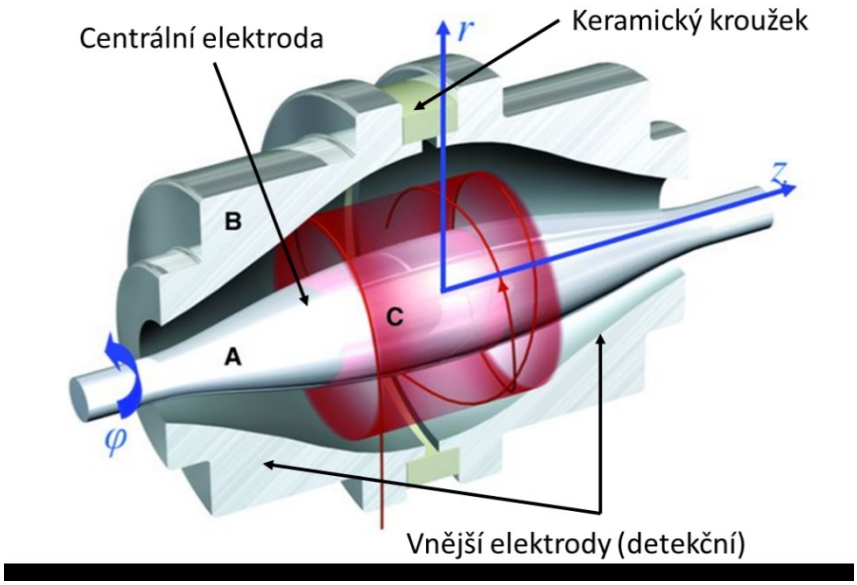
Orbitrap je nejnovější typ hmotnostního analyzátoru, který byl na trh uveden v roce 2005 firmou Thermo Electron (dnes Thermo Fisher Scientific). Díky extrémně vysokému rozlišení (až 500 000), vysoké správnosti určení *m/z* (<1 ppm) (***Olsen, J.V. et al, 2005***) a cenové dostupnosti se tato technologie 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 velmi tenkou štěrbinou (**Obr. 5**). 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 axiální oscilace iontů (***ω***) závisí pouze na poměru jejich *m/z*, a je vyjádřena jednoduchým vztahem, kde ***k*** je konstanta daného orbitálního analyzátoru.

$$\omega = \sqrt{\frac{z}{m}k}$$

Frekvence oscilace iontů podél centrální elektrody vytváří indukovaný proud na vnějších elektrodách. Po amplifikaci tohoto signálu a Fourierově transformaci se získá výsledné hmotnostní spektrum (***Zubarev, R.A. et al, 2013***). Protože ionty musí kolem středové elektrody urazit desítky až stovky kilometrů, než je dokončena jejich analýza, správné fungování orbitální pasti vyžaduje vytvoření ultravysokého vakua (10^{-13} bar).



Obr. 5: Rozvržení elektrod elektrostatické orbitální pasti
Zdroj: https://www.researchgate.net/profile/Joe_Snow/publication/277503705/figure/fig8/AS:667921898553347@1536256398164/A-cut-away-model-of-the-orbitrap-mass-analyser-A-Central-electrode-B-An-outer_W640.jpg

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 (proteomika, lipidomika, metabolomika). (***Zubarev, R.A. et al, 2013***)

3.5.3 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 analyzátory zaznamenávají indukovaný proud s následnou přeměnou na signál.

3.5.4 Skenovací módy

V hmotnostní spektrometrii lze získávat záznam v několika různých skenovacích módech. **Sken celého spektra** (**Full Scan, Full-MS)** zaznamenává všechny ionty ve zvoleném rozmezí *m/z*, které prošly analyzátorem a dopadly na detektor. Tento typ záznamu poskytuje velké množství informací, nicméně u přístrojů s jednotkovým rozlišením je problém se selektivitou a citlivostí měření. Naopak u MS s vysokým rozlišením je tento mód využíván jak pro kvalitativní, tak kvantitativní účely. Pokud zaznamenáváme pouze konkrétní hodnotu m/z hovoříme o **selektivním záznamu iontu** (**selected ion monitoring, SIM**). Ve srovnání se skenem celého spektra je pomocí tohoto módu dosaženo vyšší citlivosti i selektivity (v závislosti na rozlišení analyzátoru). V případě fragmentace vybraného parentního iontu a sledování vzniklého fragmentu (dceřiného iontu) se jedná

o **záznam zvolených iontových reakcí** (**selected reaction monitoring, SRM**), někdy je tento mód označován jako tzv. multiple reaction monitoring (MRM). Oproti SIM poskytuje zásadně vyšší specifitu, která je v řadě případů spojená i s vyšší citlivostí. Pokud sledujeme všechny vzniklé produktové ionty z iontu prekurzorového, jedná se o **sken produktových iontů** (Product ion scanning). Obdobným způsobem můžeme sledovat všechny prekurzorové ionty (**precurzor ion scan**), kde získáváme informaci o všech přechodech, kde z různých parentních iontů vzniká jeden typický fragment. Nebo **sken neutrálních ztrát** (**Neutral loss scan**), který umožňuje detekci látek ztrácející stejnou část molekuly (např. glukuronidy) v podobě neutrální částice.

3.6 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 tkáně jsou velmi komplexní matrice obsahující proteiny, lipidy, soli a další organické a anorganické látky, které mohou během analýzy interferovat s měřenými 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***)

Proteinová precipitace (PP) je jeden z nejvyužívanějších přístupů v analýze léčiv. Je rychlá, jednoduše proveditelná a aplikovatelná pro široké spektrum malých molekul, ať už hydrofilní nebo hydrofobní povahy. Princip PP spočívá v přídavku precipitačního činidla ke vzorku v poměru rovném nebo vyšším jeho objemu (např. 1:3 nebo 1:4). Nejčastěji se využívá přídavku s vodou mísitelného organického rozpouštědla (acetonitril, metanol, isopropanol), $ZnSO_4$ nebo organických či anorganických kyselin. Po centrifugaci vzniká proteinová peletka a supernatant, který lze rovnou analyzovat, případně vysušit a rekonstituovat. PP je metoda, která ze vzorku odstraňuje především proteiny, na jiné složky jako fosfolipidy nemá zásadní vliv. Proto u tohoto přístupu je nutné počítat s interferencemi, které mohou ovlivňovat citlivost a specificitu stanovení, a v případě hmotnostní spektrometrie je zde riziko významných matricových efektů, především iontové suprese (***Polson, C. et al, 2003; Liang, Z., 2012***). Využití PP s analýzou na hmotnostním spektrometru také vyžaduje jeho častější čištění.

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) je dalším dobře zavedeným atraktivním přístupem v úpravě biologických vzorků. Ve srovnání s PP produkuje čistější extrakty, které lze navíc jednoduše zakoncentrovat. LLE je metoda založena na přestupu nepolárního analytu z vodného vzorku do extrakční organické fáze (ethylacetát, dichlormetan, hexan, metyl tert-butyl éter, a další) (***Meyers, R.A. 2011***). Volba organického rozpouštědla a správné nastavení pH významně ovlivňuje selektivitu a účinnost extrakce. Výhodou této

techniky je přestup pouze omezeného spektra látek do extrakčního rozpouštědla, což znamená vyšší čistotu vzorků bez obsahu solí. To je pozitivně spojeno s redukcí matricových efektů. Nevýhodou je obtížná simultální extrakce látek s odlišnou polaritou (***Kole, P.L. et al, 2011, Meyers, R.A. 2011***). Pro LC-MS analýzu je obvykle nutné extrakční činidlo nejprve odpařit a poté rekonstituovat v rozpouštědle kompatibilním s mobilní fází. Alternativním přístupem, který odpaření nevyžaduje, je SALLE (Salting-out Assisted Liquid-Liquid Extraction). Jedná se typ LLE, ve které se využívají s vodou mísitelná organická rozpouštědla jako extrakční činidla, a koncentrovaný roztok soli, který umožní oddělení vodné fáze od organické (***Tang, Y.Q. et al, 2013***).

Extrakce na pevné fázi (SPE) je metoda založená na principu selektivního zachycení analytu k sorbentu, odstranění balastních látek, a následnému uvolnění analytu do elučního činidla. V případě, že eluční činidlo je na vodné bázi (u HILIC náplně), lze vzorek nastříknout rovnou. SPE podobně jako LLE umožňuje odstranění nežádoucích složek matrice a zakoncentrování vzorku. V současné době se jedná pravděpodobně o nejpoužívanější konvenční techniku úpravy vzorků, která dosahuje vysoké selektivity, reprodukovatelnosti a výtěžnosti extrakce. Nevýhodou je časová náročnost na provedení extrakce a její cena. Provedení SPE v 96 jamkových destičkách, nebo on-line zabudování SPE do chromatografického systému (***Chen, L. et al, 2009***) jsou velmi využívané alternativy ke klasickému kolonkovému uspořádání. (***Kole, P.L. et al, 2011; Meyers, R.A. 2011***). V současnosti je velmi populární využití proteinové precipitace s následným přečištěním vzorku pomocí tzv. hybridních SPE kolonek, které efektivně vychytávají fosfolipidy a rezidua proteinů. Díky odstranění fosfolipidové složky jsou matricové efekty významně redukovány (***Ahmad, S. et al, 2012***).

3.7 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 zamyšlené 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 předchozí verzi z roku 2001 (***FDA 2001***) a pracovní verzi z roku 2013 (***FDA 2013***), které již nereflektovaly rychlý rozvoj a využívání LC-MS (***Kadian, N. et al, 2016***). V současnosti je směrnice FDA 2018 velmi 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 totožná. Důkladné porovnání obou směrnic je shrnuto v práci autorů 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. V následujících odstavcích budou proto popsány validační parametry vycházející ze směrnice EMA 2011.

I. Selektivita

II. Přenos analytů

III. Spodní limit kvantifikace

IV. Kalibrační křivka

V. Přesnost

VI. Preciznost

VII. Diluční integrita

VIII. Matricové efekty a výtěžnost

IX. Stabilita

3.7.1 Selektivita (Selectivity)

Selektivita je schopnost metody jednoznačně odlišit analyzovanou látku a vnitřní standard (IS, Internal Standard) od možných interferujících složek matrice. Selektivita se stanovuje analýzou šesti různých blankových vzorků, tj. bez přítomnosti analytu a IS, po úpravě zvoleným procesem. Metoda je selektivní, pokud v daném retenčním čase je odezva matrice menší než 20 % odezvy analytu na spodním limitu kvantifikace (LLOQ, Lower Limit of Quantification), a menší než 5 % u IS.

3.7.2 Přenos analytů (Carry-Over)

Přenos analytů je způsoben vyplavením zbytkového množství analytů z chromatografického systému (kolony, spoje, nástřikový systém) během následujícího nástřiku. Tento děj může nastat v případě nadměrné adsorpce analytu v systému anebo při vysokých koncentracích analytu ve vzorku. Přenos analytů se během validace provádí jako nástřik blankového vzorku po analýze nejvyššího kalibračního vzorku. Akceptovatelné hodnoty přenosu jsou do 20 % LLOQ a v případě IS do 5 %.

3.7.3 Spodní limit kvantifikace (LLOQ, Lower Limit of Quantification)

LLOQ je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze stanovit spolehlivě s definovanou přesností a precizností. LLOQ je pokládán za nejnižší kalibrační bod.

3.7.4 Kalibrační křivka (Calibration curve)

Kalibrační křivka je matematickým vyjádřením závislosti intenzity měřeného signálu na koncentraci analytu. Kalibrační křivka musí sestávat z minimálně šesti nenulových bodů, plus z čisté matrice bez analytů a čisté matrice bez analytů a IS. Kalibrátory se připravují přidáním známého množství analytů do blankové matrice. Kalibrace se připravují pro minimálně tři individuální měření. Sestavená kalibrační závislost (vycházející pouze z nenulových bodů) by v optimálním případě měla být lineární, nelineární modely jsou akceptovatelné, je však nutno je zdůvodnit. Kalibrační závislost se popíše danou funkcí (zvolí se regresní rovnice). Pro ověření správnosti kalibrace jsou koncentrace jednotlivých

kalibračních bodů zpětně přepočítány, přičemž povolená odchylka je 15 % (20 % u LLOQ). Toto kritérium musí splnit alespoň 75 % kalibračních bodů.

3.7.5 Přesnost (Accuracy)

Přesnost označuje těsnost shody mezi průměrnou stanovenou hodnotou a hodnotou nominální (skutečnou), vyjadřuje se v procentních jednotkách. Provádí se měřením pěti vzorků na 4 koncentračních hladinách (***LLOQ***; ***QCA*** = maximálně trojnásobek LLOQ; ***QCB*** = 30-50 % kalibračního rozmezí; ***QCC*** = hodnota nad 75 % kalibračního rozmezí). Vzorky se připravují spikováním daného množství analytu a IS do matrice. Naměřené hodnoty se přepočítávají na kalibrační závislost a neměly by se lišit o více než 15 % (20 % na LLOQ). Pro validační účely se stanovuje přesnost v každé měřené sérii (Within-run accuracy) a dohromady mezi všemi sériemi (Between-run accuracy; minimální počet sérií jsou tři).

3.7.6 Preciznost (Precision)

Preciznost analytické metody popisuje těsnost shody výsledků mezi jednotlivými měřeními vzorků o dané nominální koncentraci. Hodnota je vyjádřena v procentech jako variační koeficient (relativní směrodatná odchylka od průměru). Podobně jako přesnost se preciznost stanovuje měřením pěti vzorků na čtyřech různých koncentracích (LLOQ, QCA, QCB a QCC) a stanovuje se v každé sérii měření a mezi všemi sériemi. Variační koeficient nesmí přesáhnout 15 % (20 % u LLOQ).

3.7.7 Diluční integrita (Dilution integrity)

Diluční integrita je parametr, který ověřuje, zdali naředění vzorků neovlivní spolehlivost měření. Provádí se přidáním analytu o koncentraci větší, než je horní kalibrační bod do blankového vzorku s následným naředěním blankovou matricí. Hodnotí se přesnost a preciznost s povolenou odchylkou do 15 %.

3.7.8 Matricové efekty (ME, Matrix effect)

ME jsou fenoménem, který se týká především hmotnostní spektrometrie, a mají zásadní dopad na spolehlivost získaných kvantitativních výsledků. Pro každý analyt a IS se

stanovuje tzv. **matriční faktor** (***MF$_A$*** a ***MF$_{IS}$***), který se vypočítá jako poměr plochy píku analytu nebo IS naspikované do blankového extraktu matrice proti ploše analytu nebo IS naspikovaného do čistého rozpouštědla. Následně se stanoví vnitřním standardem normalizovaný matriční faktor (***MF$_N$***) pro daný analyt, který se vypočítá jako poměr MF analytu a MF vnitřního standardu. Matricové efekty normalizované vnitřním standardem dle směrnice EMA 2011 můžeme vyjádřit následujícím vztahem:

$$MF_N\ (\%) = \frac{MF_A}{MF_{IS}} = \frac{A/B}{IS_A/IS_B} \times 100$$

Matricové efekty, by se měly stanovovat v šesti různých individuálních matricích na minimálně dvou koncentračních úrovních (QCA a QCC). Variační koeficient *MF$_N$* by neměl být vyšší než 15 %.

Existují však i speciální případy, kde je dle této směrnice obtížné hodnotit matricové efekty. Například v analýze endogenních látek nejsme schopni získat čistou matrici, a analýza arteficiálně připravené nereflektuje skutečné složení. Proto je vhodné ME hodnotit i dvěma alternativními způsoby:

I. Postkolonovou infúzi analytu s kontinuálním monitoringem signálu v závislost na čase po nástřiku vzorku. Tímto způsobem získáme alespoň kvalitativní informaci o matricových efektech. (***Van Eeckhaut, A. et al, 2009***)

II. Porovnáním směrnic kalibrační přímky analytů připravených v čistém rozpouštědle a analytů naspikovaných do matrice. V případě rovnosti obou směrnic jsou ME zanedbatelné. (***Matuszewski, B.K., 2006***)

3.7.9 Stabilita (Stability)

Stabilita by měla být hodnocena kvůli ověření, že žádný z kroků přípravy, analýzy a skladování vzorků negativně neovlivňuje koncentrace analytů. Hodnotí se na dvou koncentračních úrovních – nízké (QCA) a vysoké (QCC). Porovnávají se koncentrace analytů po aplikaci testovaných podmínek s koncentracemi čerstvě připravených kontrolních

vzorků. Rozdíl oproti nominální hodnotě by měl být do 15 %. Směrnice doporučuje hodnocení těchto stabilit:

I. Stabilita zásobních a pracovních roztoků a vnitřního standardu

II. Krátkodobá stabilita analytu v nativním vzorku při laboratorní teplotě – časový interval by měl pokrýt dobu přípravy a manipulace se vzorkem, od rozmrazení po analýzu

III. Dlouhodobá stabilita analytu v nativním vzorku v – standardně se hodnotí stabilita analytů ve vzorku skladovaném v mrazícím boxu při -20 nebo -80 ℃ po dobu odpovídající reálnému naměření studie – obvykle minimálně 30 dnů.

IV. Stabilita při rozmrazení a zamrazení – vzorky jsou opakovaně zamrazeny a následně rozmrazeny (obvykle 3 cykly).

3.7.10 Výtěžnost (Recovery)

Výtěžnost není v této směrnici popsána, nicméně je to parametr, který by měl přesto být hodnocen. Výtěžnost charakterizuje kvalitu úpravy biologického materiálu, tím že popisuje ztráty analytu během přípravy vzorku. Hodnotí se jako poměr plochy analytu ve vzorku přidaném po extrakci, vůči ploše analytu ve vzorku přidaném do matrice před extrakcí. Dle doporučení FDA 2018 není potřeba dosáhnout 100% výtěžnosti, ale výtěžnost musí být konzistentní a reprodukovatelná.

3.8 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. et al, 2011***).

Farmakokinetické hodnocení xenobiotik a jejich metabolizace se v posledních dvou desetiletích stala zcela klíčové v oblasti vývoje a hodnocení nových potenciálních léčiv. Díky předsunutí 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., 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 velmi slibná látka může být na základě neschopnosti dosáhnout cílového kompartmentu (v případě AD, 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. Pro přehlednost je v **Tab. 1** uveden přehled základních farmakokinetických parametrů s jejich výpočtem (***Khojasteh, S.C. et al, 2011***).

U farmakokinetických studií se stanovuje závislost koncentrace léčiva v plazmě, nebo jiném materiálu, na čase (***Khojasteh, S.C. et al, 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 studiemi, 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***).

Veličina	Zkratka	Definice	Výpočet
Dávka	D	Množství podané látky	Součást designu experimentu
Nejvyšší koncentrace	C_{max}	Stanovená nebo extrapolovaná nejvyšší koncentrace	Měřeno
Čas od podání do C_{max}	T_{max}	-	Měřeno
Distribuční objem	V_d	Objem, ve kterém by se musela rozpustit celá dávka, aby byla dosažena stejná koncentrace léčiva jako v plasmě.	$V_d = \frac{D}{C_0}$
Biologický poločas	$T_{1/2}$	Čas, za který klesne koncentrace léčiva v plasmě na polovinu	$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_e}$
Eliminační konstanta	k_e	Číselná hodnota vyjadřuje rychlost, s jakou dochází k odstranění léčiva z organizmu	$k_e = \frac{Cl}{V_d}$
Clearence	Cl	Objem plasmy, který se úplně očistí od léčiva za jednotku času	$Cl = \frac{D}{AUC}$
Absorpční konstanta	k_a	Číselná hodnota vyjadřuje rychlost, s jakou dochází ke vstřebání do organizmu	$T_{max} = \frac{\ln(\frac{k_a}{k_e})}{k_a - k_e}$
Biologická dostupnost	BA	Část léčiva vstřebatelná po perorálním podání	$BA = \frac{AUC_{p.o.} \times D_{i.v.}}{AUC_{i.v.} \times D_{p.o.}}$
Plocha pod křivkou	AUC	Integrál závislosti koncentrace léčiva na čase (po jedné dávce nebo v rovnovážném stavu)	$AUC_{0-\infty} = \int_0^{\infty} C\ dt$

Tab. 1: Popis základních farmakokinetických parametrů

Zdroj: ***Khojasteh, S.C. et al, 2011***

3.8.1 Kompartmentová metoda

Kompartmentová metoda předpokládá, že tělo lze zjednodušeně popsat jako sérii propojených, dobře prostupných a kineticky homogenních kompartmentů neboli oddílů/jednotek ohraničených membránou, které jsou v celém svém objemu homogenní, tj. představují zjednodušený model skutečnosti. Chování látek v kompartmentu nebo systému kompartmentů lze vyjádřit některými základními parametry uvedenými v **Tab. 1**, pomocí kterých lze postihnout dynamické děje, které mezi látkou a kompartmentem probíhají. Pohyb látky mezi těmito kompartmenty je definován pomocí rychlostních konstant. Složitost celého systému se odvíjí od počtu kompartmentů, kde řešení kompartmentové metody je založeno na výpočtu exponenciálních rovnic pomocí nelineární regresní analýzy (***Fan, J. et al, 2014; Khojasteh, S.C. et al, 2011***). Dle počtu kompartmentů rozlišujeme:

I. **Jednokompartmentový model** – model se snaží jednoduchým způsobem napodobit živý systém, který je složen z jednoho kompartmentu, do nějž se podá dávka xenobiotika (*D*) a dochází k metabolizaci a exkreci. Počáteční koncentraci C_0 lze odvodit ze vztahu D/V_d, a koncentrace v konkrétním čase C_t závisí na rychlosti eliminace (metabolizace + exkrece). Pokud xenobiotikum vykazuje kinetiku prvního řádu, jeho koncentrace v čase je přímo úměrná rychlosti eliminace,

$$C_t = C_0 e^{-K_e t}$$

kde K_e je eliminační konstanta prvního řádu. Pokud daný vztah vyjádříme logaritmicky, abychom získali lineární závislost koncentrace na čase, matematický zápis vypadá následovně (***Fan, J. et al, 2014***):

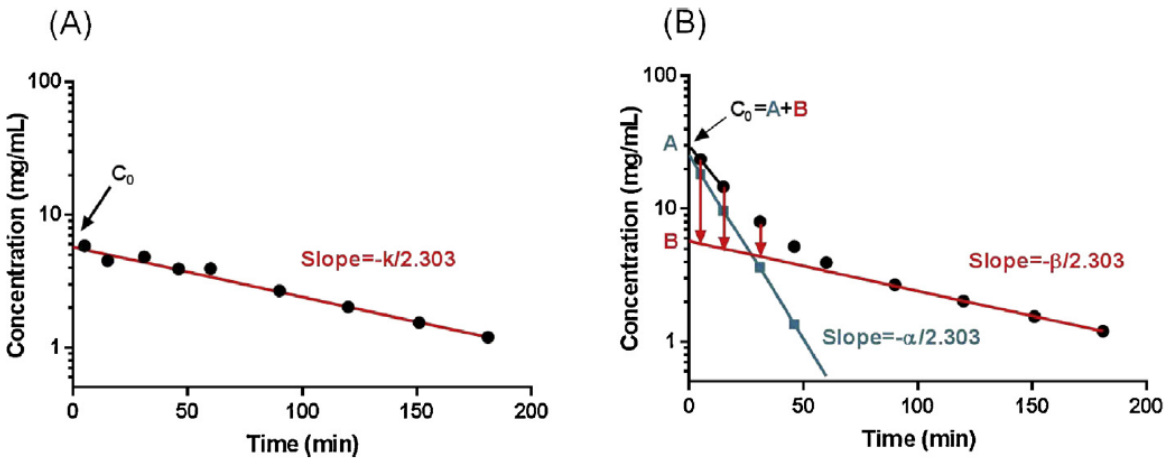
$$lnC_t = lnC_0 - K_e t$$

II. **Dvoukompartmentový model** – jednokompartmentový model nezohledňuje rozdílnost různých části těla, jako jsou svaly, tělesný tuk, mozek nebo ledviny, které se liší cévním zásobením, permeabilitou kapilár nebo hydrofilním/lipofilním

složením. Pro reálný popis chování xenobiotika v organismu je potřeba mnohem komplexnějších matematických modelů. Nejjednodušší variantou je dvoukompartmentový otevřený model, který rozlišuje mezi periferním kompartmentem představovaným málo perfundovanými tkáněmi, a centrálním kompartmentem, který představuje plazmu a vysoce perfundované tkáně. Tento model popisuje distribuční fázi (fáze α), která spočívá v rychlém přenosu látky z centrálního kompartmentu do periferního. Následuje fáze eliminační (fáze β), která má pomalý průběh. Matematické vyjádření bifázického průběhu křivky popisuje rovnice: (***Fan, J. et al, 2014***)

$$C_t = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

kde parametry *A* a *α* popisují fázi distribuce, a parametry *B* a β fázi eliminace. Semilogaritmické vyjádření časového průběhu plazmatické koncentrace po *i.v.* podání xenobiotika pro jedno a dvoukompartmentový model znázorňuje **Obr. 6**.



Obr. 6: Časový průběh plazmatické koncentrace po *i.v.* aplikaci léčiva v semilogaritmickém vyjádření, které vykazuje jednokompartmentový (A) a dvoukompartmentový model (B)

Zdroj: ***Fan, J. et al, 2014***

III. **Tříkompartmentový model** – se vzrůstajícím množstvím kompartmentů systém nabývá na složitosti. Tento model je ve srovnání s dvoukompartmentovým rozšířen o druhý periferní kompartment, který je stejně jako první tvořen málo perfundovanými tkáněmi (***Bailey, J.M. et al, 1991***).

3.8.2 Nekompartmentová metoda

Nekompartmentová metoda ignoruje jednotlivé kompartmenty, a ve srovnání s kompartmentovým modelem je založena na aplikaci statistické teorie – momentech náhodné proměnlivosti (***Yamaoka, K. et al, 1978***). Tato teorie vychází z předpokladu, že průchod léčiva organismem a jeho proudění do tělních tekutin je pokládán za náhodný proces, který je příčinou míry variability. Nejdůležitějším parametrem pro výpočet momentů náhodné proměnlivosti je plocha pod koncentrační křivkou léčiva v závislosti na čase $\boldsymbol{AUC_{0-\infty}}$**.** Jestliže je distribuce léčiva čistě pravděpodobnostní funkce potom $AUC_{0-\infty}$ nultého momentu $\boldsymbol{\mu_0}$ je rovna 1, platí vztah (***Dostálek, M., 2006***):

$$\mu_0 = \int_0^{\infty} f(t) \times dt = AUC_{0-\infty}$$

Pokud je léčivo distribuováno nenáhodně hovoříme o prvním momentu $\boldsymbol{\mu_1}$, který je definován jako ***střední distribuce*** s označením ***AUMC***, vyjadřuje plochu pod koncentrační křivkou ***f(t)*** prvního momentu v čase ***t*** (***Dostálek, M., 2006***).

$$\mu_1 = \int_0^{\infty} t \times f(t) \times dt = AUMC_{0-\infty}$$

Existují i další momenty $\boldsymbol{\mu_2}$, který je definován proměnlivostí distribuce, nebo momenty $\boldsymbol{\mu_3}$ a $\boldsymbol{\mu_4}$, které jsou definovány pro nesouměrnost proměnlivosti v distribuci. Poměr momentů $\boldsymbol{\mu_1}$ a $\boldsymbol{\mu_0}$ vyjadřuje tzv. ***střední pobytový čas*** (mean residence time, MRT), který udává průměrnou dobu, po kterou zůstává léčivo v organismu, než je eliminováno.

Stanovuje se z hodnot AUC a určuje dobu nutnou k poklesu látky na 1/3 původní koncentrace (odpovídá asi 1,5násobku poločasu eliminace) (***Dostálek, M., 2006***).

$$MRT = \frac{\mu_1}{\mu_0} = \frac{\int_0^\infty t \times f(t) \times dt}{\int_0^\infty f(t) \times dt} = \frac{AUMC}{AUC}$$

Pomocí MRT se dopočítávají další parametry: biologický poločas, střední absorpční čas, clearance nebo distribuční objem (***Fan, J. et al, 2014; Dostálek, M., 2006***).

3.8.3 Absorpce, Distribuce, Metabolismus a Eliminace

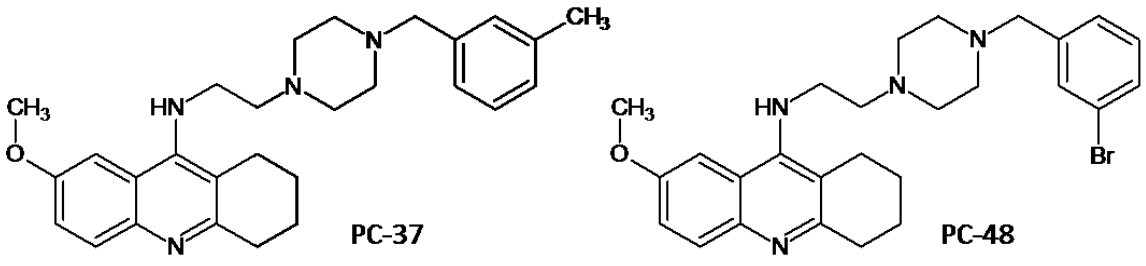
Osud léčiva v organismu je popisován čtyřmi základními fázemi – absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece. **Absorpce** je charakterizována rychlostí, jakou se léčivo dostává z místa aplikace do krevního oběhu. Závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva, lékové formě a lokálních podmínkách 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 přes membrány, která 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 exkreci z organismu. Např. lipofilní léčiva jsou metabolizována na ve vodě rozpustnější formy, které mohou být snadněji vyloučeny. 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 (kys. glukuronovou, sírovou, octovou, glutathionem, methioninem a dalšími) a vyloučením močí nebo žlučí. Metabolity léčiv mohou mít odlišnou biologickou aktivitu, mohou ztrácet nebo naopak získávat žádanou farmakodynamickou

účinnost, nebo mít na organismus toxické účinky. **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. et al, 2011***)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACÍM

4.1 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. et al, 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 Aβ (***Korábečný, J. et al, 2014; Sepsova, V. et al, 2015***).



Obr. 7: 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_{50} včetně konfidenčního intervalu (***Kassa, J. et al, 2014***). Hodnota LD_{50} 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 studií, 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.

4.1.1 Cíl práce

Z výše uvedených *in vitro* a *in vivo* studií vyplynulo, že se jedná o slibné látky. Proto stanovení základních farmakokinetických parametrů v centrálním a periferním kompartmentu, popsání orgánové distribuce, identifikace metabolitů a určení cesty eliminace, byly primárním cílem naší práce. Splnění tohoto cíle vyžadovalo:

- **I.** Vývoj a validaci analytické metody pro stanovení látek PC-37 a PC-48 v plazmě a mozkovém homogenátu potkana.
- **II.** Stanovení hladin PC-37 a PC-48 v dalších biologických matricích (moč, žluč, ledviny a játra) pro popis distribuce a eliminace.
- **III.** Provedení *in vitro* metabolických experimentů pomocí jaterních mikrozomů s následnou identifikací metabolitů v *in vivo* podmínkách u potkanů.
- **IV.** Aplikace vyvinutých bioanalytických metod do studia farmakokinetiky a metabolismu, hodnocení schopnosti přestupu přes HEB

4.1.2 Komentář k publikované práci

Výsledky této práce jsme se rozhodli rozdělit do dvou publikací. První metodická, která popisovala vlastní metodu LC-MS stanovení, její validaci a základní aplikaci v získání farmakokinetického profilu látky PC-48 v plazmě potkanů (**příloha č. 1**). Druhá práce, která se v rámci metodické části odkazuje na první, doplnila informace o farmakokinetickém profilu obou látek, se zaměřením na hodnocení prostupu do mozku, distribucí do orgánů, eliminací a metabolismem (**příloha č. 2**).

Před vývojem bioanalytické metody je potřeba zvážit několik potenciálních kritických bodů, vycházejících z chemické struktury analytů, jejich fyzikálně-chemických vlastností jako je pK_a, rozpustnost, předpokládaná stabilita, nebo schopnost nespecifické adsorpce na skleněné nebo plastové povrchy, schopnost disociace, ale také možnosti detekce. K tomu je potřeba přizpůsobit zacházení se vzorky a vybrat vhodný analytický přístup (***Moein, M.M. et al, 2017***). V našem případě se jednalo o látky, u kterých jsme neočekávali problémy se stabilitou nebo nadměrnou adsorbcí na povrch zkumavek. Z pohledu struktury a disociace obou látek (pK_a je u obou látek 8,9 tj. spadají mezi slabé báze) jsme předpokládali standardní chromatografické chování na reverzních fázích. Zastoupení čtyř atomů dusíků v molekule (ve formě tří terciárních a jednoho sekundárního aminu) predikovalo dostatečný potenciál k ionizaci pomocí ESI (Ionizace elektrosprejem) nebo APCI (Chemická ionizace za atmosférického tlaku).

Základním předpokladem pro stanovení koncentrací v různorodých biologických matricích a jejich úspěšné transformaci do farmakokinetické studie bylo vyvinutí analytické metody, která bude dostatečně citlivá (očekáváné 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 provedení experimentu disponovalo naše pracoviště 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. I když hmotnostní spektrometr LTQ-XL překonává určité nevýhody 3D-iontové pasti v kvantitativní analýze, spojené především s tvorbou prostorového náboje (***Schwartz, J.C. et al, 2002***), ve srovnání s trojitými kvadrupóly zaostává ve skenovací rychlosti, lineárním dynamickém rozsahu,

a také v citlivosti (***Rousu, T. et al, 2010***). Z těchto důvodů bylo nejdříve nutné optimalizovat nastavení základních parametrů hmotnostního spektrometru (MS), tak aby bylo dosaženo co nejvyšší citlivosti pro obě látky se zachováním stability signálu. Tento postup byl testován individuálně jak pro ESI, tak APCI. Optimalizovaným nastavením MS parametrů a napětím na elektrospreji jsme dosáhli řádově vyšší citlivosti ve srovnání s APCI. Vzhledem k jednotkovému rozlišení našeho 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. Pro kvantitativní účely byl vybrán jeden dominantní fragment. Výsledné nastavení hmotnostního spektrometru je uvedeno v **příloze č. 1**.

V průběhu vývoje metody byly chromatografické podmínky optimalizovány s ohledem na rozlišení obou látek, tvar píku, citlivost a dobu analýzy. Na začátku byly testovány tři typy sorbentů (C18, RP-Amid, ES-CN) s univerzálně nastaveným složením mobilní fáze a gradientem. Nejlepšího tvaru píku a citlivosti bylo dosaženo s využitím kolony Ascentis Express RP-Amide (75 mm × 2.1 mm, 2.7 µm; Supelco Analytical), která využívá core-shell technologii. Zároveň bylo optimalizováno složení mobilní fáze, průběh gradientu, rychlost průtoku, vše s ohledem na délku analýzy. Parametry vyvinuté chromatografické metody lze shrnout následovně: separace látek ve vzorku probíhala na koloně Ascentis Express RP-Amide (75 mm × 2.1 mm, 2.7 µm, Supelco Analytical) při teplotě 30 ℃ 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.

Posledním krokem ve vývoji bioanalytické metody byl výběr a optimalizace vhodné extrakční metody a výběr vnitřního standardu. V hmotnostní spektrometrii je při vývoji extrakční metody nutností dbát nejen na opakovatelnost extrakce a dostatečnou výtěžnost, ale především je potřeba eliminovat nebo kompenzovat matricové efekty (***Panuwet, P. et al, 2016***). Třemi základními metodami úpravy vzorku jsou extrakce na tuhé fázi (SPE), extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a proteinová precipitace (PP). Úprava vzorku pomocí SPE je v řadě případů vhodná z pohledu opakovatelnosti, výtěžnosti extrakce a minimalizace matricových efektů. Nicméně časová, a především finanční náročnost provedení SPE z ní činila až metodu poslední volby. Proto byla přednostně testována úpravu

vzorku pomocí proteinové precipitace acetonitrilem a metanolem v různých poměrech precipitačního činidla k objemu vzorku. Ani v jednom případě však nebylo dosaženo uspokojivých výsledků, především kvůli nízké citlivosti z důvodu naředění vzorku organickým rozpouštědlem. Vývoj a optimalizace LLE byl tedy dalším logickým krokem, který lze zařadit mezi nejkomplikovanější část vývoje metody. Byla testována celá řada organických rozpouštědel (ethylacetát, hexan, dichlormetan, methyl tert-butyl ether) a jejich kombinace, bez úpravy pH nebo vliv bazického prostředí. Z hlediska výtěžnosti a opakovatelnosti extrakce látek bylo vybráno několik kandidátních extrakčních směsí, které byly v následující fázi experimentu testovány s použitím panelu vnitřních standardů. Cílem bylo vybrat takové vnitřní standardy, které sníží variační koeficient opakovatelnosti extrakce v sérii. V navazujících experimentech byl hodnocen vliv jednotlivých extrakčních směsí a vnitřních standardů na linearitu kalibrace. Jako nejvhodnější vnitřní standard pro obě látky byl vybrán reserpin. Finální metoda úpravy vzorku je shrnuta následovně: do 4 ml polypropylenových zkumavek bylo ke 240 µl plazmy přidáno 10 µl IS, 100 µl 0,5M NaOH a 1,5 ml extrakční směsi ethylacetát:dichlormetan (80:20, v/v). Po krátkém promíchání na vortexu následovalo třepání na mechanické třepačce (10 min), centrifugace (3 500 x g, 5 min) s následným odebráním a odpařením 1 ml supernatantu, a rekonstitucí ve 100 µl 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. Detaily validačního procesu včetně výsledků pro látku PC-48 lze nalézt v **příloze č. 1**. 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. Výsledky těchto experimentů však nejsou součástí přiložených publikací.

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_{50}. 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 ± 11,98 ng/ml v čase 10,83 min pro PC-37 a 39,09 ± 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 Kp (poměr plochy pod křivkou AUC_{mozek}/AUC_{plazma}) byl 5,41 pro PC-37 a 2,11 pro PC-48. 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 Pajouhesha (***Pajouhesh, H. et al, 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 naši následující studie, která se zabývala identifikací části molekuly donepezilu zodpovědné za aktivní přestup přes HEB (**příloha č. 3**), 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 (A^2)	40,63	40,63		<60-70

TPSA – Topologická polární povrchová plocha molekuly

Tab. 2: 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 velmi rychle pronikaly do jaterní i ledvinné tkáně s následným přestupem do žluči nebo moči. Vyšší

koncentrace obou látek v ledvinách a moči poukazují na převažující renální eliminaci. Biologický poločas obou látek byl řádově ve stovkách minut, 827 ± 142 min pro PC-37 a 1 065 ± 246 min pro PC-48. Ve srovnání s donepezilem (za podobných experimentálních podmínek) se jedná o přibližně desetinásobně delší eliminační poločas (**příloha č. 3**).

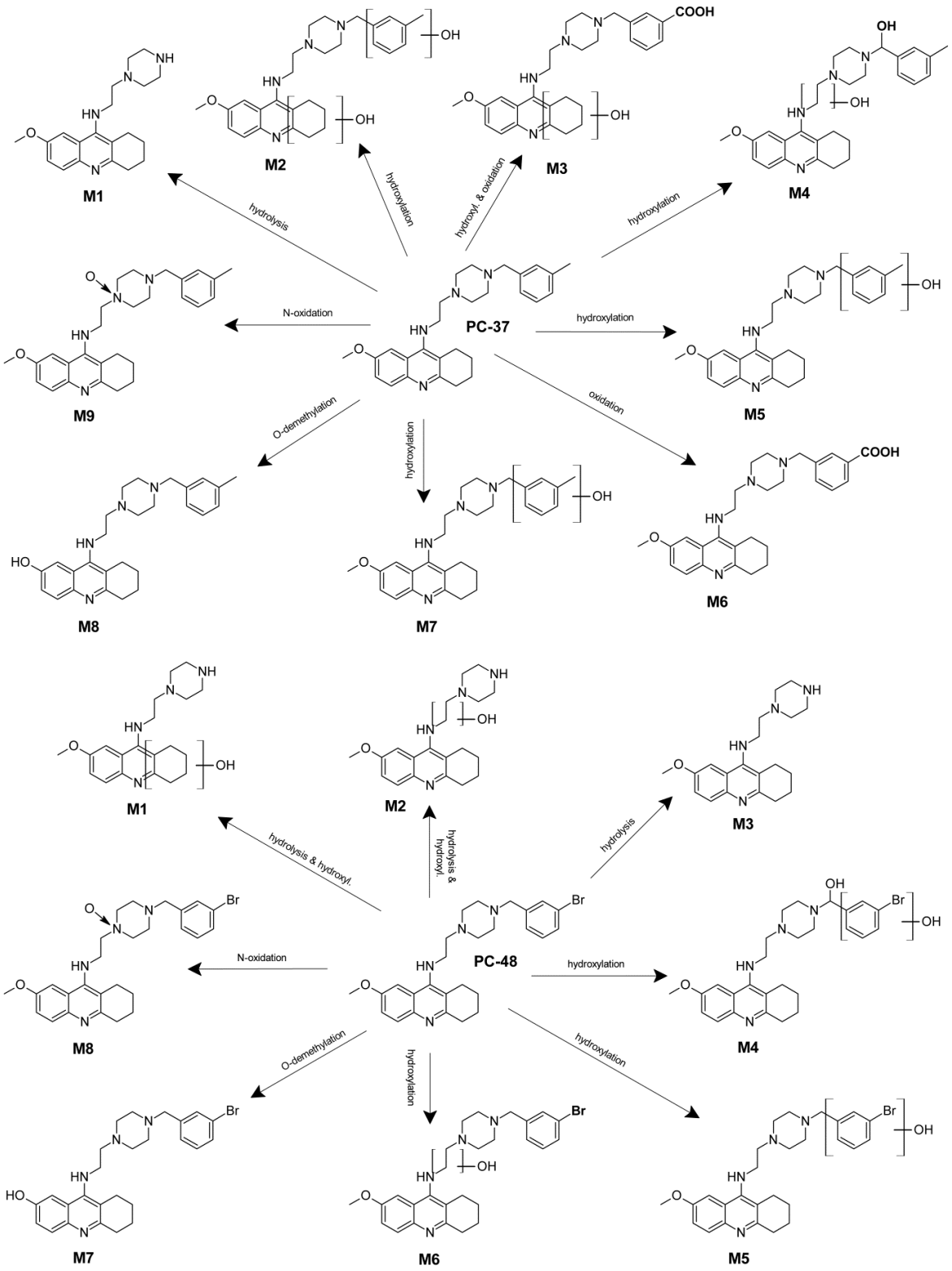
Metabolické profilování nových chemických entit je nezanedbatelná část v procesu vývoje a bioanalytického hodnocení nových léčiv. Přímá identifikace metabolitů PC-látek v biologickém materiálu (především moči) získaných z *in vivo* studie byla, vzhledem k nízkým plazmatickým koncentracím parentních látek, a tudíž i metabolitů, poměrně komplikovaný úkol. Z tohoto důvodů 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.

Před provedením vlastních metabolických experimentů bylo nezbytně nutné detailně porozumět fragmentačnímu chování parentních látek. To spočívalo v provedení MS^n experimentů čistých standardů až do úrovně limitovanou především velikostí molekuly produktových iontů (limit 50 *m/z*). Pro tyto účely jsme využili hmotnostní spektrometr LCQ Fleet IT/MS (Thermo Scientific), jehož parametry iontového zdroje a iontové optiky byly optimalizovány pro co nejvyšší citlivost parentních látek. Záznam spekter byl získán jak pro ionizační zdroj ESI, tak APCI. Na základě známé chemické struktury parentních látek byly pomocí softwaru ACD/ChemSketch (v 14.01, Advanced Chemistry Development, Inc.) odvozeny struktury jednotlivých vznikajících fragmentů. Přesná znalost fragmentace obou molekul nám poskytla nezbytný základ pro správnou interpretaci spekter metabolitů.

Detailní protokol inkubace a složení jednotlivých inkubačních směsí je uveden v **příloze č. 2**. 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, Torrace, 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

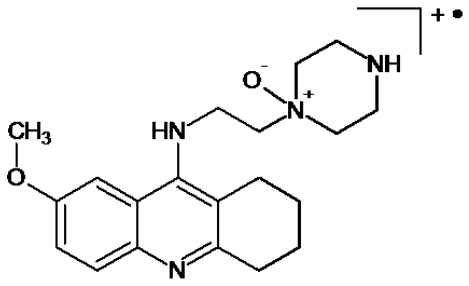
s data-dependentním skenováním, pomocí kterého se automaticky spouštěly fragmentace vybraných parentních iontů až do úrovně MS^3. Tím byla získána potřebná fragmentační spektra pro odvození struktury metabolitů. Analýzy byly provedeny v pozitivním módu s využitím ionizačního zdroje ESI i APCI. Kombinace 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 (vázáného 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.

V *in vitro* experimentech s lidskými mikrozomy se nám podařilo identifikovat celkem devět metabolitů látky PC-37 a osm metabolitů látky PC-48 (**Obr. 8**). 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 **příloze č 2**. 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).



Obr. 8: Metabolity PC-37 a PC-48 identifikované v *in vitro* experimentu s mikrozomy

V době dokončených a vyhodnocených *in vitro* metabolických experimentů byl na naše pracoviště pořízen a instalován hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením (HRMS) využívající technologii Orbitrap, model Q-Exactive Focus (Thermo Scientific, San Jose, USA). HRMS umožňuje přesné určení atomárního složení molekul. Především díky jeho vysokému rozlišení (*R* = 70 000) a vysoké správnosti určení *m/z* (většinou s chybou do 1 *ppm* při využití tzv. lock mass pro interní kalibraci *m/z*) jsme byli schopni naše výsledky jednoznačně potvrdit. Jako zajímavý příklad mohu uvést jeden vznikající fragment z metabolitu *N*-oxidu, který při cílené fragmentaci ztrácí ze své molekuly substituovaný metylbenzen za vzniku tohoto kation-radikálu:



M_{mi} = 356,22068 Da

Na základě správného určení *m/z* pomocí HRMS jsme byli schopni jednoznačně identifikovat ztrátu jednoho elektronu z molekuly (s chybou správnosti určení *m/z* 0,5 ppm), a tím vytvoření kladně nabitého iontu. Tvorba kation-radikálů během fragmentace parentní molekuly není v hmotnostní spektrometrii nic neobvyklého. Především v CID módu (Collision induced dissociation) může docházet ke ztrátě elektronu během homologního štěpení kladně nabité molekuly (***Demarque, D.P. et al, 2016***).

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 popsaných 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.

4.1.3 Dosažení cílů

I. Vyvinuli jsme citlivou a selektivní metodu pro kvantitativní stanovení látek PC-37 a PC-48 v plazmě a mozkovém homogenátu potkana. Metodu jsme následně validovali dle aktuálních doporučení – všechny validační parametry splnily příslušná kritéria.

II. Pro kvantitativní stanovení obou látek v dalších biologických matricích (moč, žluč, ledviny, játra) jsme provedli částečnou validaci zavedené metody pro každý typ matrice – všechny validační parametry splnily příslušná kritéria.

III. Na základě provedených *in vitro* metabolických experimentů jsme identifikovali celkem 9 metabolitů u látky PC-37 a 8 metabolitů u látky PC-48. Ve vzorcích moči jsme identifikovali sedm z devíti popsaných metabolitů u látky PC-37, a šest z osmi u látky PC-48.

IV. Vyvinuté bioanalytické metody jsme aplikovali v experimentech na laboratorních zvířatech. U obou studovaných látek jsme zjistili základní farmakokinetické parametry a popsali jejich chování v organismu. PC-37 i PC-48 byly schopné přestupovat přes HEB a akumulovat se v mozku.

4.2 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/nekompetitivní 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 gastrointenstinálním traktu (***Cheewakriengkrai, L. et al, 2013***). Donepezil spadá do kategorie duálních inhibitorů – je schopen inhibovat aktivitu AChE a zároveň snižovat schopnost agregace Aβ (***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.

4.2.1 Cíl práce

Hlavním cílem práce byla Identifikace části molekuly donepezilu zodpovědné za aktivní přestup přes HEB a akumulaci v mozku. Pro dosažení cíle bylo nutné:

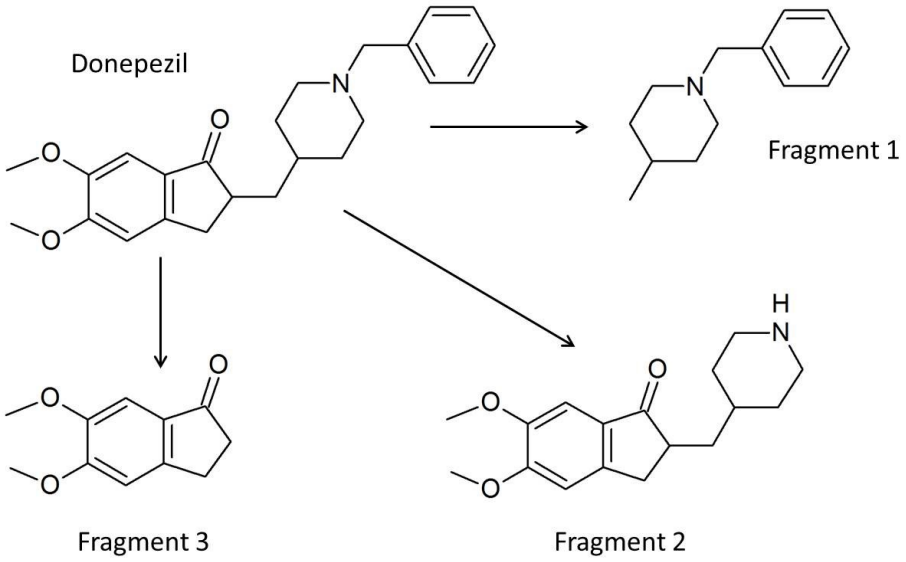
I. Vyvinout a validovat citlivou analytickou metodu pro stanovení donepezilu a jeho tří fragmentů v plazmě a mozkovém homogenátu potkana.

II. Metodu aplikovat ve farmakokinetické studii, zjistit základní farmakokinetické parametry studovaných látek, a objasnit vztah struktura-přestup do mozku.

4.2.2 Komentář k publikované práci

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-1*H*-inden-1-on) a fragment **3** (5,6-dimethoxy-2,3-dihydro-1*H*-inden-1-on) (**Obr. 9**). Schopnost aktivního přestupu přes HEB byla hodnocena na základě farmakokinetického profilu jednotlivých látek, především parametru Kp, odvozeného z celkové plochy pod křivkou látky v mozku a plazmě ($Kp = AUC_{mozek}/AUC_{plazma}$), který vyjadřuje míru přestupu analytu z plazmy do mozku a jeho akumulaci.

Standard donepezilu a fragmentů **2** a **3** jsme zakoupili od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), fragment **1** nebyl komerčně dostupný, proto byl nasyntetizován. Protokol chemické syntézy je uveden v **příloze č. 3**.



Obr. 9: 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. Jelikož se jedná o důležitý analytický prvek, který v našem případě znamenal několikanásobné zvýšení citlivosti stanovení především u fragmentu **3**, následuje popis principiálního rozdílu mezi skenovacími módy Full-MS a SIM v systému Orbitrap.

Ve skenovacím módu Full-MS jsou zaznamenávány všechny ionty v definovaném rozsahu *m/z*. Kvadrupól v tomto režimu vystupuje jako hmotnostní filtr s širokým záběrem, který do C-Trapu (iontová past sloužící pro zachycení iontů a jejich následnou ejekci do orbitrapu) pouští pouze ionty v určitém hmotnostním rozmezí. Tento přístup tedy umožňuje detekci všech ionizovaných látek, což má především význam v kvantitativní i kvalitativní analýze většího počtu analytů, a zároveň tento mód umožňuje retrospektivní hodnocení dat. Jedná se o vůbec nejpoužívanější skenovací mód, který je vhodný pro většinu aplikací (***Kaufman, A. et al, 2018***). Oproti tomu v SIM modu se kvadrupól nastavuje pro konkrétní hodnotu *m/z* (šíře okna je 0,4 Da), kde ionty jsou po průletu zachycovány v C-Trapu. Maximální akumulovatelná kapacita C-Trapu je omezená – přibližně $3x10^6$ nabitých částic (***Perry, R.H. et al, 2008***). Avšak během ionizace vzniká řádově větší množství iontů, proto se do C-Trapu v časovém pulzu pouští jen jejich malá část. V případě SIM modu kvadrupól značně redukuje množství propuštěných iontů – je omezen pouze na úzké izolační okno. To nám umožňuje nastavit delší časový segment (ion injection time) pro akumulaci iontů – C-Trap se plní především ionty, které nás zajímají. Jelikož časově nejnáročnější část jednoho měřícího cyklu připadá na samotnou detekci iontů v orbitrapu (přibližně 280 ms při rozlišení *R* = 70 000), C-Trap má dostatečně dlouhou dobu se naplnit do maximální kapacity i u nízkého počtu generovaných iontů (nízkých koncentrací analytů), a tím značně navýšit citlivost stanovení (***Strupid, K. et al, 2016***). Určitým úskalím SIM modu, na které je nutné myslet, je technický „nedostatek“ kvadrupólu, který by měl optimálně propouštět nastavenou *m/z* ± 0,2 Da (reálně však *m/z* ± 0,4 Da). Tím vzniká prostor, aby se přes kvadrupól dostaly i jiné molekuly (např. z matrice), které posléze naplňují C-Trap spolu s analytem. Aby bylo dosaženo maximální citlivosti v SIM modu a jeho využití mělo analytický smysl, je nutné tyto balastní ionty redukovat – pokud pocházejí z matrice např. na úrovni úpravy biologických vzorků nebo chromatografické separace. Výsledné nastavení SIM modu při rozlišení *R* = 70 000 bylo: maximální naplnění C-Trapu 2×10^5 nabitých částic, a maximální časový limit jeho plnění 210 ms.

V rámci vývoje chromatografické metody byly testovány dvě UHPLC kolony s odlišnou stacionární fází – Luna Omega 1,6 µm Polar C18 (50 × 2,1 mm ID; Phenomenex, Torrace, USA) a Biphenyl 1,9 µm (50 × 2,1 mm ID; Phenomenex, Torrace, USA). S kolonou Luna C18 bylo dosaženo lepšího tvaru píků, byť separace jednotlivých látek nebyla úplná.

Nicméně z pohledu nastavené hmotnostně spektrometrické analýzy úplná separace nebyla nutná.

Vývoj extrakční metody i v tomto případě postupoval od nejjednoduššího přístupu – proteinové precipitace (ACN, MeOH a jejich kombinace). Tato úprava vzorku však byla zavržena kvůli nízké citlivosti a výraznějším matricovým efektům. Následně byla testována LLE do různých organických rozpouštědel a jejich směsí s/bez úpravy pH. Výsledným extrakčním postupem byla LLE pomocí metylu tert-butyl éteru (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 jsme, s ohledem na linearitu metody a matricové efekty v obou biologických materiálech (plazma, mozek), vybrali 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. Kompletní přehled validačních tabulek, včetně informací o reprodukovatelnosti kalibračních závislostí, je uveden v **příloze č. 3**.

Z naměřené farmakokinetické studie byl získán koncentrační profil a následně byly dopočítány farmakokinetické parametry donepezilu a jeho tří fragmentů v plazmě a mozku – detailní informace jsou uvedeny v **příloze č. 3**. Fyzikálně-chemické vlastnosti donepezilu a jeho tří fragmentů **1**, **2** a **3** splňovaly Lipinského i Pajouheshova kritéria pro teoretický přestup molekul přes HEB (**Tab. 3**) – 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 (A^2)	38,77	3,24	47,56	35,53		<60-70

TPSA – Topologická polární povrchová plocha molekuly

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

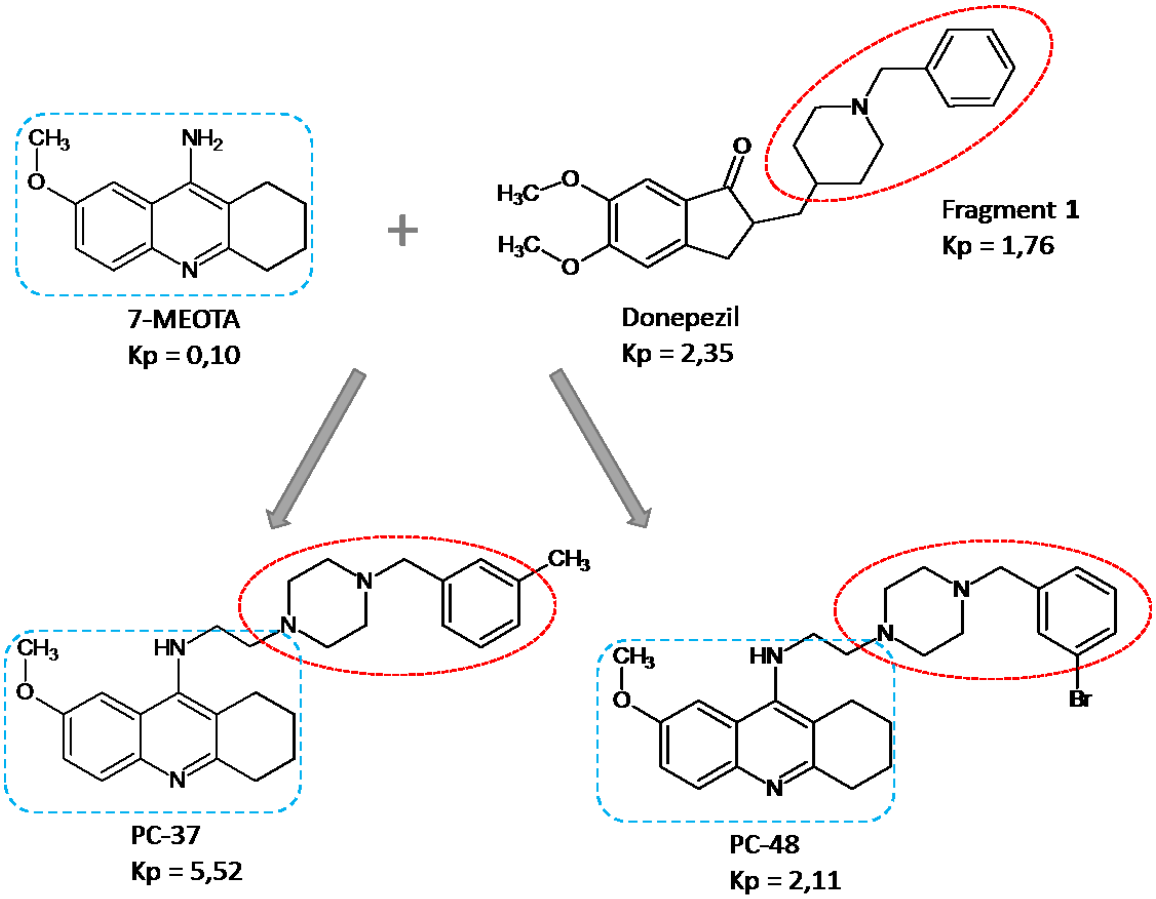
Donepezil dosáhl svojí maximální plazmatické koncentrace C_{max} = 48,74 ng/ml v čase 8,33 min, maximální koncentrace v mozku C_{max} = 75,42 ng/mg dosáhl o několik minut později – v čase 27,50 min. Už z parametru C_{max} je patrné, že donepezil prostupuje do mozku v daleko větší míře, než by mohlo odpovídat pouhé pasivní difuzi. Na existenci aktivního transportu lze usuzovat i z poměru ploch pod křivkou mozku a plazmy (Kp = AUC_{mozek}/AUC_{plazma}), který činí 2,35. Tento nález je očekávaný, řada publikací uvádí podobné výsledky (***Geerts, H. et al, 2005; Kim, M.H. et al, 2010***). Kim M. H. se svými kolegy (***Kim, M.H. et al, 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 (Kp = 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** (methylpiperidinylový derivát fragmentu **3**) prostupuje do mozku jen v omezené míře (Kp = 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 (Kp = 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 Kp 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 (**příloha č. 2**). Obě tyto látky, vzniklé spojením molekuly donepezilu a 7-methoxytakrinu (7-MEOTA), obsahují ve své struktuře isosterický benzylpiperazin (**Obr. 10**). PC-37 i PC-48 vykazují farmakokinetický profil podobný donepezilu – po *i.m.* aplikaci PC látek jejich koncentrace v mozku převýší plazmatické hladiny (Kp = 5,52 pro PC-37, Kp = 2,35 pro PC-48), a jejich eliminace z mozkové tkáně je výrazně pomalejší než z plazmy. Naopak 7-MEOTA prostupuje do mozku jen ve velmi omezené míře (Kp = 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. 10: Schématické znázornění struktury PC látek

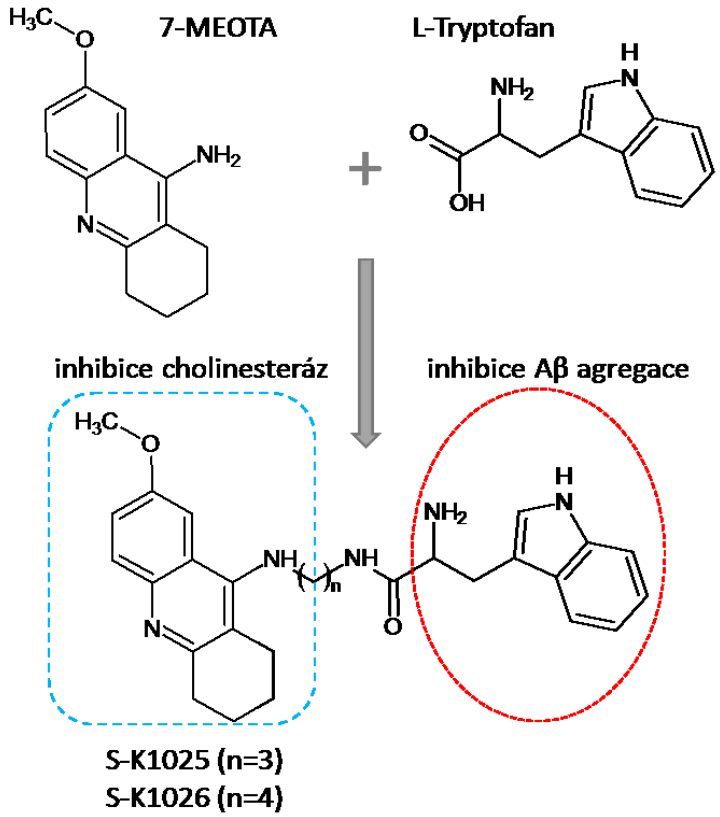
4.2.3 Dosažení cílů

I. Vyvinuli jsme citlivou a rychlou LC-HRMS metodu pro stanovení donepezilu a jeho tří fragmentů v plazmě a mozkovém homogenátu potkana. Provedli jsme plnou validaci dle aktuálních doporučení pro oba typy matrice – ve všech parametrech jsme splnili příslušná kritéria.

II. Metodu jsme aplikovali ve farmakokinetické studii, popsali jsme chování studovaných látek v organismu a identifikovali část molekuly donepezilu zodpovědnou za aktivní transport přes HEB.

4.3 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**). 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 strukturní rozdíl mezi S-K1025 (n = 3) a S-K1026 (n = 4) (**Obr. 11**). 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 (**příloha č. 4**).



Obr. 11: Schématické zobrazení struktury S-K látek

L-Trp, aromatická esenciální aminokyselina, je prekurzorem serotoninu, který je významným neurotransmiterem. Řada studií prokázala, že tryptofan hraje důležitou roli v patogenezi AD. Např. u pacientů s AD byla prokázána spojitost mezi sníženým příjmem *L*-Trp a sníženou schopnosti učení a paměti (***Porter, R.J. et al, 2000***), v další studii byla prokázána schopnost významně redukovat agregaci a intraneuronální akumulaci Aβ (***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 postrádá (**příloha č. 4**). 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 (**příloha č. 4**).

4.3.1 Cíl práce

S-K1025 a S-K1026 jsou experimentální látky se zajímavým farmakodynamickým profilem a nízkou toxicitou. Proto byly vybrány jako kandidátní látky pro bioanalytické hodnocení. Primárním cílem bylo popsat chování látek v organismu – k naplnění tohoto cíle bylo nutné:

- **I.** Vyvinou a validovat kvantitativní metodu pro stanovení S-K1025 a S-K1026 v plazmě a mozku potkanů
- **II.** Provést *in vitro* a *in vivo* metabolické experimenty a identifikovat vznikající metabolity
- **III.** Aplikovat vyvinuté bioanalytické metody do studia farmakokinetiky a metabolismu. Zhodnotit schopnost látek přestupovat do mozku.

4.3.2 Komentář k publikované práci

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 (**příloha č. 4**). Omezená schopnost pasivní difúze 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.

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 (A^2)	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 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_{50}. Pro farmakokinetickou analýzu byla použita nekompartmentová metoda. Detailní popis farmakokinetického experimentu je uveden v **příloze č. 5**.

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).

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 specificitu stanovení neprokázalo žádný interferenční vliv složek matrice – S-K1025 a S-K1026 mohly být měřeny jako $[M+H]^+$ 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.

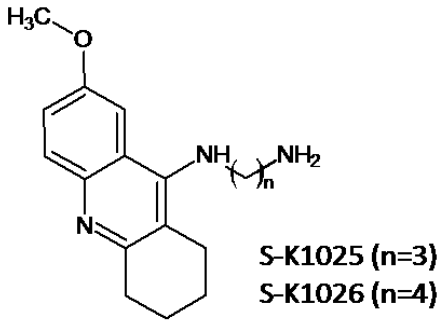
Vývoj chromatografické metody spočíval v testování různých typů chromatografických kolon (C18, fenyl-hexyl, pentafluorofenyl, bifenyl), složení mobilní fáze, průtokové rychlosti a velikosti nástřiku, vše s ohledem na zachování určité „hygieny“ chromatografického systému. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s použitím kolony Luna Omega 1,6 µm Polar C18 (50 × 2,1 mm ID; Phenomenex, Torrace, USA). Detailní popis chromatografické metody a výsledné nastavení hmotnostního spektrometru je uveden v **příloze č. 5**.

Optimalizace extrakční metody je důležitá nejenom pro dosažení požadované citlivosti, reprodukovatelnosti a eliminaci matricových efektů, ale také je nutné zvážit ekonomickou i časovou náročnost metody, nebo spektrum extrahovatelných analytů. Díky dostatečné analytické citlivosti a pro plné využití skenovacího modu Full-MS byla vybrána a optimalizována proteinová precipitace (PP) pomocí metanolu, který obsahoval celkem 10 potenciálních vnitřních standardů. Tak byl v rámci validačního procesu vybrán nejvhodnější vnitřní standard 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. Všechny hodnocené parametry splnily stanovená kritéria, viz **příloha č. 5**. Validovaná metoda byla využita pro naměření farmakokinetické studie, byl získán koncentrační profil obou látek a vypočítány jejich základní farmakokinetické parametry.

S-K1025 dosáhla přibližně o třetinu vyšší maximální plazmatické koncentrace (C_{max} = 409,14 ng/ml) než S-K1026 (C_{max} = 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_d = 630,98 l/kg pro S-K1025, V_d = 419,41 l/kg pro S-K1026). Ten můžeme vysvětlit buďto relativně vysokým log*P* obou látek (**viz 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. Vyvstává zde hned několik možných vysvětlení: **I.** z pohledu fyzikálně-chemických vlastností obě látky nesplňují příslušné teoretické atributy (***Pajouhesh, H. et al, 2005***), **II.** látky s topologickou polární povrchovou plochou molekuly větší než 70 $Å^2$ a s více než dvěma donorovými vodíkovými vazbami jsou daleko častěji rozpoznávány P-glykoproteinem (***Hitchcock, S.A., 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 hydrolýze za vzniku metabolitu M1 (**Obr. 12**). 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 mozkovém homogenátu dosahuje 30-50 % jeho plazmatické koncentrace.



Obr. 12: Metabolit M1

Úplná neschopnost S-K1025 i S-K1026 přestupovat přes HEB je s velkou pravděpodobností zapříčiněna kombinací všech tří faktorů s nejvýznamnějším přispěním karboxyesteráz. Nicméně existují sofistikované strategie, jak tento problém překonat. Jednou z nich je využití technologií nanočástic, které umožňují navázáni látek na jejich povrch nebo jádro s následným zacílením na určitý typ buňky nebo intracelulární kompartment (***Li, X. et al, 2017***). Existují již publikace, které se zabývají využitím transportních nanočástic v léčbě Alzheimerovy demence (***Martin-Rapun, R. et al, 2017; Li, Y. et al, 2018***).

Identifikace a popsání metabolitů S-K1025 a S-K1026 v podmínkách *in vitro/vivo* byla další součást této práce. Pro jejich spolehlivou identifikaci bylo nutné plně porozumět hmotnostně-spektrometrickému chování (především fragmentačnímu) obou parentních látek. Analýzou čistých standardů pomocí LC-HRMS jsme získali potřebná data z fragmentačních analýz. K hodnocení a popisu všech struktur/fragmentů byly použity programy ChemCalc (***Patiny, L. et al, 2013***) a ACD/ChemSketch (v 14.01, Advanced Chemistry Development, Inc.).

In vitro metabolické experimenty byly svým provedením velmi podobné metabolickému profilování PC látek – inkubační protokol a podmínky chromatografické separace byly převzaty z naší předcházející práce (**příloha č. 2**). Kompletní metabolická analýza byla provedena na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením Q-Exactive Focus. Screening neznámých metabolitů byl proveden ve dvou fázích. V první obecné jsme provedli necílenou analýzu vzorků s využitím skenovacího módu Full-MS/AIF (AIF, All Ion Fragmentation), který kombinoval záznam celého spektra $[M+H]^+$ iontů se záznamem

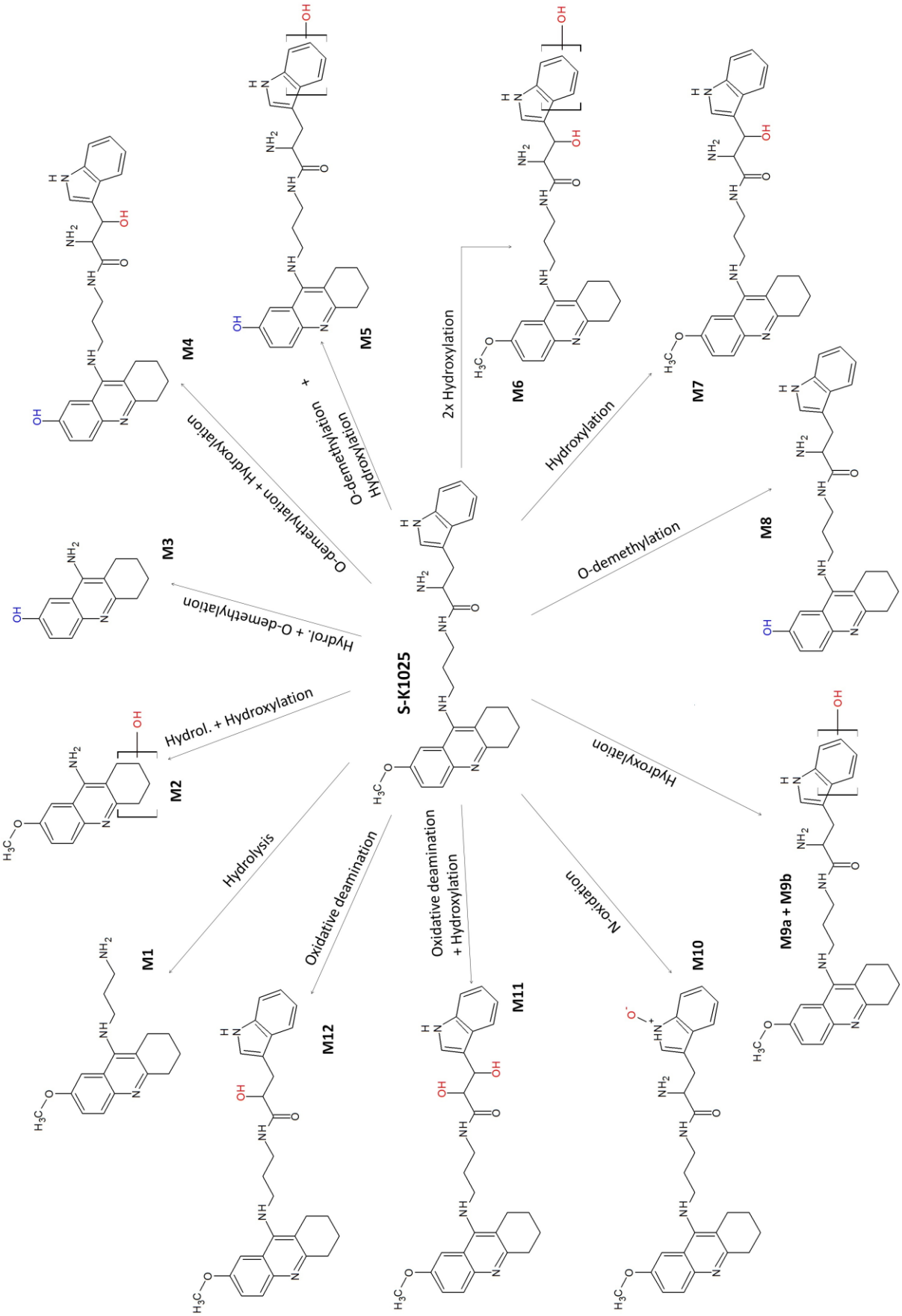
fragmentačního spektra vzniklého kolizí všech dostupných iontů. Na základě přesného určení *m/z* analytů, jejich izotopových obálek a generovaných fragmentů byl sestaven seznam potenciálních metabolitů. Protože fragmentační spektrum získané ze skenovacího módu AIF neumožňovalo jednoznačně přiřadit vzniklé fragmenty jednotlivým metabolitům, byli jednotliví kandidáti analyzováni individuálně. Fáze dvě proto 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. Detailní nastavení jednotlivých skenovacích módů je uvedeno v **příloze č. 5**.

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). Pro názornost je na **Obr. 13** uveden schématický přehled všech *in vitro* metabolitů látky S-K1025, pořadí metabolitů je dáno jejich retenčními časy.

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 popis všech metabolitů obou látek, včetně popisu diagnostických fragmentů je uveden v **příloze č. 5**.

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.



Obr. 13: Metabolity S-K1025 identifikované v *in vitro* experimentu s jaterními mikrozomy

4.3.3 Dosažení cílů

I. Vyvinuli jsme citlivou LC-HRMS metodu pro kvantitativní stanovení S-K1025 a S-K1026 v plazmě a mozku potkana. Metodu jsme úspěšně validovali dle aktuálních doporučení – všechny hodnocené parametry splnily příslušná kritéria.

II. Provedli jsme metabolické experimenty v *in vitro* podmínkách s využitím lidských jaterních mikrozomů, kde jsme u obou látek identifikovali celkem 13 metabolitů. V *in vivo* experimentu jsme v moči potkanů prokázali 7 z 13 popsaných metabolitů látky S-K1025 a 9 z 13 u S-K1026.

III. Vyvinutou bioanalytickou metodu jsme aplikovali ve studii na laboratorních zvířatech. Popsali jsme farmakokinetické parametry obou studovaných látek a identifikovali primární příčinu jejich neschopnosti prostupovat přes HEB.

5 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 směrování 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 (Kp = 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 Aβ. 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 Aβ. 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.

6 SEZNAM PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

Příloha č. 1

MZIK, M. – KORABECNY, J. – NEPOVIMOVA, E. – VOŘÍŠEK, V. – PALIČKA, V. – KUCA, 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_{2016} = 2,603**

Příloha č. 2

ZDAROVA KARASOVA, J. – **MZIK, M.** – HROCH, M. – KORABECNY, J. – NEPOVIMOVA, E. – VORISEK, V. – PALICKA, V. – KUCA, 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_{2018} = 2,452

Příloha č. 3

ZDAROVA KARASOVA, J. – SESTAK, V. – KORABECNY, J. – MEZEIOVA, E. – PALICKA, V. – KUCA, 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_{2018} = 2,813**

Příloha č. 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. **IF_{2018} = 4,833**

Příloha č. 5

MZIK, M. – KARASOVA ZDAROVA, J. – CHALUPOVA, K. – KORABECNY, J. – PALICKA, 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_{2018} = 2,983**

7 LITERATURA

AGO, Y. – KODA, K. – TAKUMA, K. – MATSUDA, T. Pharmacological aspects of the acetylcholinesterase inhibitor galantamine. *J Pharmacol Sci*. 2011, **116**(1), 6-17.

AHMAD, S. – KALRA, H. – GUPTA, A. – RAUT, B. – HUSSAIN, A. – RAHMAN, M.A. HybridSPE: A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC-ESI-MS Bioanalysis. *J Pharm Bioallied Sci*. 2012, **4**(4), 267-275.

ALAM, S. – LINGENFELTER, K.S. – BENDER, A.M. – LINDSLEY, C.W. Classics in Chemical Neuroscience: Memantine. *ACS Chem Neurosci*. 2017, **8**(9), 1823-1829.

ALI, I. - AL-OTHMAN, Z.A. - NAGAE, N. - GAITONDE, V.D. - DUTTA, K.K. Recent trends in ultra-fast HPLC: New generation superficially porous silica columns. *J Sep Sci*. 2012, **35**(23), 3235-3249.

ALONSO, A.C. - GRUNDKE-IQBAL, I. – IQBAL, K. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med*. 1996, **2**(7), 783-787.

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

AWARD, H. – KHAMIS, M.M. – EL-ANEED, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *App Spec Rev*. 2015, **50**(2), 158-175.

BAILEY, J.M. – SHAFER, S.L. A simple analytical solution to the three-compartment pharmacokinetic model suitable for computer-controlled infusion pumps. *IEEE Trans Biomed Eng*. 1991, **38**(6), 522-525.

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.

BALLARD, C.G. Advances in the treatment of Alzheimer's disease: Benefits of dual cholinesterase inhibition. *Eur. Neurol*. 2002, **47**(1), 64-70.

BAR-AM, O. – WEINREB, O. – AMIT, T. – YOUDIM, M.B. The novel cholinesterase-monoamine oxidase inhibitor and antioxidant, ladostigil, confers neuroprotection in neuroblastoma cells and aged rats*. J Mol Neurosci*. 2009, **37**(2), 135–145.

BARTOLINI, M. – BERTUCCI, C. – CAVRINI, V. – ANDRISANO, V. beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: Inhibition studies. *Biochem Pharmacol.* 2003, **65**(3), 407–416.

BARTUS, R.T. - DEAN, R.L. - BEER, B. - LIPPA, A.S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*. 1982, **217**(4558), 408-414.

BEACH, T.G. - POTTER, P.E. - KUO, Y.M. - EMMERLING, M.R. - DURHAM, R.A. - WEBSTER, S.D. - WALKER, D.G. - SUE, L.I. - SCOTT, S. - LAYNE, K.J. - ROHER, A.E. Cholinergic deafferentation of the rabbit cortex: a new animal model of Aβ deposition. *Neurosci. Lett*. 2000, **283**(1), 9-12.

BOESL, U. Time-of-flight mass spectrometry: Introduction to the basics. *Mass Spectrom Rev*. 2017, **36**(1), 86-109.

BOLOGNESI, M.L. - BANZI, R. - BARTOLINI, M. - CAVALLI, A. - TAROZZI, A. - ANDRISANO, V. - MINARINI, A. - ROSINI, M.; -TUMIATTI, V. - BERGAMINI, C. – FATO, R. – LENAZ, 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 stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991, **82**(4), 239–259.

BRANCIA, F.L. Recent developments in ion-trap mass spectrometry and related technologies. *Expert Rev Proteomics*. 2006, **3**(1), 143-151.

BRENTON, A.G. – GODFREY, A.R. Accurate mass measurement: terminology and treatment of data. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2010, **21**(11), 1821-1835.

BUTT, H. J. - GRAF, K. - KAPPL, M. *Physics and chemistry of interfaces*. Wiley, 2006. ISBN: 978-3-527-60640-5

CANO-ABAD, M.F. – VILLARROYA, M. – GARCIA, A.G. – GABILAN, N.H. – LOPEZ, M.G. Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J Biol Chem.* 2001, **276**(43), 39695–39704.

CAO, J. – HOU, J. – PING, J. – CAI, D. Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2018, **13**(1), 64.

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.

CONTESTABILE, A. The history of the cholinergic hypothesis. *Behav Brain Res*. 2011, **221**(2), 334-340.

CORBETT, A. - SMITH, J. - BALLARD, C. New and emerging treatments for Alzheimer's disease. Expert Rev. *Neurother*. 2012, **12**(5), 535-543.

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.L. 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.

DEEMTER, J.J. - ZUIDERWEG, F.J. - KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistence to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chem. Eng. Sci*. 1956, **5**, 271–289.

DEJMEK, L. 7-MEOTA, *Drug Future*, 1990, **15,** 126-129.

DEMARQUE, D.P. – CROTTI, A.E. – VESSECCHI, R. – LOPES, J.L. – LOPES, N.P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat Prod Rep*. 2016, **33**(3), 432-455.

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.

DIXON, R.W. - PETERSON, D.S. Development and Testing of a Detection Method for Liquid Chromatography Based on Aerosol Charging. *Anal. Chem*. 2002, **74**(13), 2930-2937.

DOSTÁLEK, M. a kol. *Farmakokinetika*. Grada, 2006. ISBN: 8024714647

DRACHMAN, D.A. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology*. 1977, **27**(8), 783-790.

DVIR, H. – SILMAN, I. – HAREL, M. – ROSENBERRY, T.L. – SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chem Biol Interact*. 2010, **187**(1-3), 10-22.

DYRKS, T. – WEIDEMANN, A. – MULTHAUP, G. – SALBAUM, J.M. – LEMAIRE, H.G. – KANG, J. - MULLER-HILL, B. – MASTERS, C.L. – BEYREUTHER, K. Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J.* 1988, **7**(4), 949–957.

EAGGER, S.A. - LEVY, R. - SAHAKIAN, B.J. Tacrine in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1991, **337**(8748), 989-992.

EL-ANEED, A. – COHEN, A. – BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. Applied spectroscopy reviews. 2009, **44**(3), 210-230.

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

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

FANG, L. – KRAUS, B. – LEHMANN, J. – HEILMANN, J. – ZHANG, Y. – DECKER, M. Design and synthesis of tacrineferulic acid hybrids as multi-potent anti-Alzheimer drug candidates. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008, **18**(9), 2905–2909.

FARIA, A.M. – COLLINS, C.H. – JARDIM, I.C.S.F. State-of-the-Art in Immobilized Polymer Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography. *J Braz Chem Soc*. 2009, **20**(8), 1385-1398.

FARRIS, W. – MANSOURIAN, S. – CHANG, Y. – LINDSLEY, L. – ECKMAN, E.A. – FROSCH, M.P. – ECKMAN, C.B. – TANZI, R.E. – SELKOE, D.J. – GUENETTE, S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid

precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, **100**(7), 4162–4167

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 Metod 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. – FEKETE, J. Fast gradient screening of pharmaceuticals with 5 cm long, narrow bore reversed-phase columns packed with sub-3 mu m core-shell and sub-2 mu m totally porous particles. *Talanta*. 2011, **84**(2), 416-423.

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)**

FEKETE, S. - SCHAPPLER, J. - VEUTHEY, J.L. – GUILLARME D. Current and future trends in UHPLC. *Trac-Trends anal chem*. 2014, **63**, 2-13. **(B)**

FURUKAWA-HIBI, Y. - ALKAM, T. - NITTA, A. - MATSUYAMA, A. - MIZOGUCHI, H. - SUZUKI, K. - MOUSSAOUI, S. - YU, Q-S. - GREIG, N.H. - NAGAI, T. - YAMADA, K. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid-β peptide in mice. *Behav. Brain Res*. 2011, **225**(1), 222-229.

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.

GHOSH CHAUDHURI, R. – PARIA, S. Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. *Chem Rev*. 2012, **112**(4), 2373-433.

GRACON, S.I. - KNAPP, M.J. - BERGHOFF, W.G. - PIERCE, M. - DEJONG, R. - LOBBESTAEL, S.J. - SYMONS, J.- DOMBEY, S.L. - LUSCOMBE, F.A. - KRAEMER, D. Safety of tacrine: clinical trials, treatment IND, and postmarketing experience. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1998, **12**(2), 93-101.

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.

GUO, Y. - GAIKI, S. Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A.* 2005, **1074**(1-2), 71-80.

GUO, Y. Recent progress in the fundamental understanding of hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Analyst*. 2015, **140**(19), 6452-6466.

HAMAGUCHI, T. - ONO, K. - YAMADA, M. Anti-amyloidogenic therapies: Strategies for prevention and treatment of Alzheimer‘s disease. *Cell Mol. Life Sci*. 2006, **63**(13), 1538-1552.

HANAN AWAD, H. - KHAMISAB, M.M. - EL-ANEEDA, A. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2014, **50**(2), 158-175.

HAREL, M. - SCHALK, I. - EHRET-SABATIER, L. - BOUET, F. - GOELDNER, M. - HIRTH, C. - AXELSEN, P.H. - SILMAN, I. - SUSSMAN, J.L. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993, **90**(19), 9031-9035.

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.

HEILBRONN, E. Inhibition of cholinesterase by tetrahydroaminoacric. *Acta. Chem. Scand*. 1961, **15**, 1386–1390.

HEINISCH, S. - ROCCA, J.L. Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 2009, **1216**(4), 642-658.

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

HOKFELT, T. Looking at neurotransmitters in the microscope. *Prog Neurobiol*. 2010, **90**(2), 101-118.

HORVÁTH, C. - MELANDER, W. – MOLNÁR, I. Solvophobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases. *J Chromatogr*. 1976, **125**, 129-156.

HU, N.W. - ONDREJCAK, T. - ROWAN, M.J. Glutamate receptors in preclinical research on Alzheimer's disease: update on recent advances. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2012, **100**(4), 855-862.

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.

CHEEWAKRIENGKRAI, L. - GAUTHIER, S. A 10-year perspective on donepezil. *Expert Opin Pharmacother.* 2013, **14**(3), 331–338.

CHEN, L. – WANG, H. – ZENG, Q. – XU, Y. – SUN, L. – XU, H. – DING, L. On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography--a review. *J Chromatogr Sci*. 2009, **47**(8), 614-623.

CHEN, X. - MAGNOTTA, V.A. - DUFF, K. - BOLES PONTO, L.L. - SCHULTZ, S.K. Donepezil effects on cerebral blood flow in older adults with mild cognitive deficits. *J. Neuropsychiatr. Clin. Neurosci.* 2006, **18**(2), 178–185.

CHENG, Y. F. - WALTER, T.H. - LU, Z.L. - IRANETA, P. - ALDEN, B.A. - GENDREAU, C. - NEUE, U.D. - GRASSI, J.M. - CARMODY, J.L. - O'GARA, J.E. - FISK, R.P. Hybrid organicinorganic particle technology: Breaking through traditional barriers of HPLC separations, *Lc Gc N Am*. 2000, **18**(11), 1162-1170.

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.

ITTNER, L. - M, GOTZ, J. Amyloid-beta and tau-atoxicpasdedeux in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011, **12**(2), 65-72.

IWATA, N. – TSUBUKI, S. – TAKAKI, Y. – WATANABE, K. – SEKIGUCHI, M. – HOSOKI, E. - KAWASHIMA-MORISHIMA, M. – LEE, H.J. – HAMA, E. - SEKINE-AIZAWA, Y. - SAIDO. Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med*. 2000, **6**(2), 143–150.

JACKSON, S. - HAM RJ, WILKINSON D. The safety and tolerability of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2004, **58**, Suppl 1:1–8.

JANDERA, P. HILIC chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *Chemagazín*. 2011, **2,** 8-9.

JARONIEC M. – MARTIRE, D.E. A general model of liquid—solid chroamtography with mixed mobile phases involving concurrent adsorption and partition effects. *J Chromatogr A*. 1986, **351**, 1-16.

JARRETT, J.T. – BERGER, E.P. – LANSBURY, P.T. JR. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 1993, **32**(18), 4693–4697

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. – STOOTHOFF, 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.

JUCKER, M. – WALKER, L.C. Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013, **501**(7465), 45–51.

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.

KARAS, M. – BAHR, U. – DÜLCKS, T. Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius J Anal Chem*. 2000, **366**(6-7), 669-676.

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.

KAUFMAN, A. – BROMIRSKI, M. Selecting the best Q Exactive Orbitrap mass spectrometer scan mode for your application. *Thermo Fisher Scientific Technical Note*. 2018, **65147**.

KAZA, M. - KARAŹNIEWICZ-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

KHOURY, R. - RAJAMANICKAM, J. - GROSSBERG, G.T. An update on the safety of current therapies for Alzheimer's disease: focus on rivastigmine. *Ther Adv Drug Saf*. 2018, **9**(3), 171–178.

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.

KNAPP, M.J. - KNOPMAN, D.S. - SOLOMON, P.R. - PENDLEBURY, W.W. - DAVIS, C.S. - GRACON, S.I. A 30-week randomized controlled trial of high-dose tacrine in patients with Alzheimer's disease. The Tacrine Study Group. *J. Am. Med. Assoc*. 1994, **217**(13), 985-991.

KOLA, I. The state of innovation in drug development. *Clin Pharmacol Ther*. 2008, **83**(2), 227-230.

KOLE, P. L. – VENKATESH, G. – KOTECHA, J. – SHESHALA, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr*. 2011, **25**(1-2), 199-217.

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. – KUCA, 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.

KOROPCHAK, J.A. - HEENAN, C.L. - ALLEN, L.B. Direct comparison of evaporative light-scattering and condensation nucleation light-scattering detection for liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1996, **736**(1-2), 11-19.

LEMERE, C.A. Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine. *Prog. Brain Res*. 2009, **175**, 83-93.

LEÓN, R. – GARCIA, A.G. - MARCO-CONTELLES, J. Recent advances in the multitarget-directed ligands approach for the treatment of Alzheimer's disease. *Med Res Rev*. 2013, **33**(1), 139-189.

LI, X. - TSIBOUKLIS, J. - WENG, T. - ZHANG, B. - YIN, G. - FENG, G. - CUI, Y. - SAVINA, I.N. - MIKHALOVSKA, L.I. - SANDEMAN, S.R. - HOWEL, C.A. – MIKHALOVSKY, S.V. Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier. *J Drug Target*. 2017, **25**(1), 17-28.

LI, Y. - LIU, R.Y. - JI, W.H. - LI, Y.H. - LIU, L.Y. – ZHANG, X. Delivery systems for theranostics in neurodegenerative diseases. *Nano Res*. 2018, **11**, 5535-5555.

LIANG, X.J. – HOU, X.D. – CHAN, J.H.M. - GUO, Y. - HILDER, E.F. The application of graphene-based materials as chromatographic stationary phases. *Trends Analyt Chem*. 2018, **98**, 149-160.

LIANG, Z. Perspectives on addressing ionization matrix effects in LC-MS bioanalysis. *Bioanalysis*. 2012, **4**(10), 1227-1234.

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.

LIPTON, S.A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2006, **5**(2), 160-170.

LU, W. - BENNETT, B.D. – RABINOWITZ, J.D. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2008, **871**(2), 236-242.

MAELICKE, A. - ALBUQUERQUE, E.X. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol*. 2000, **393**(1-3), 165-170.

MAGNUSSON, L.E. - RISLEY, D.S. - KOROPCHAK, J.A. Aerosol-based detectors for liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2015, **1421,** 68-81.

MANOHARAN, I. - BOOPATHY, R. - DARVESH, S. - LOCKRIDGE, O. A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in Vysya community of India. *Clin. Chim. Acta*. 2007, **378**(1-2), 128-135.

MARTIN-RAPUN, R.- DE MATTEIS, L. - AMBROSONE, A. - GARCIA-EMBID, S. - GUTIERREZ, L. DE LA FUENTE, J.M. Targeted Nanoparticles for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des*. 2017, **23**(13), 1927-1952.

MÁTL, O. – MÁTLOVÁ, M. – HOLMEROVÁ, I. Zpráva o stavu demence 2016, Česká alzheimerovská společnost, o. p. s., s podporou MZ ČR Praha 2016. ISBN 978-80-86541-50-1 Dostupné z http://www.alzheimer.cz/res/archive/004/000480.pdf?seek=1492589048

MATSUI, K. - MISHIMA, M. - NAGAI, Y. - YUZURIHA, T. - YOSHIMURA, T. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of donepezil (Aricept) after a single oral administration to rat. *Drug Metab Dispos*. 1999, **27**(12) 1406–1414.

MATUSZEWSKI, B.K. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2006, **830**(2), 293-300.

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.

MUNOZ-TORRERO, D. – CAMPS, P. Dimeric and hybrid anti-Alzheimer drug candidates. *Curr Med Chem*. 2006, **13**(4), 399–422.

NIKITAS, P – PAPPA-LOUISU, A. Retention models for isocratic and gradient elution in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2009, **1216**, 1737-1755.

NOVÁKOVÁ, L. - DOUŠA, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* Europrint a.s., 2013. ISBN: 978-80-260-4243-3

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.

PANUWET, P. – HUNTER, R.E. JR – D'SOUZA, P.E. – CHEN, X. – RADFORD, S.A., COHEN J.R. – MARDER, M.E. – KARTAVENKA, K. – RYAN, P.B. – BARR, D.B. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Crit Rev Anal Chem*. 2016, **46**(2), 93-105.

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.

PAUL, W. Electromagnetic traps for charged and neutral particles. Rev Mod Phys. 1990, **62**, 531-540.

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.

PESEK, J.J. – MATYSKA, M.T. – YU, R.J. Synthesis and characterization of endcapped C18 stationary phases using a silica hydride intermediate. *J Chromatogr A*. 2002, **947**(2), 195-203.

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.

PICCIOTTO, M.R. – HIGLEY, M.J. – MINEUR, Y.S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*. 2012, **76**(1), 116-129.

POLSON, C. – SARKAR, P. – INCLEDON, B. – RAGUVARAN, V. – GRANT, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003, **785**(2), 263-275.

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

PORTER, R.J. - LUNN, B.S. - WALKER, L.L. - GRAY, J.M. - BALLARD, C.G. - O'BRIEN, J.T. Cognitive deficit induced by acute tryptophan depletion in patients with Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry*. 2000, **157**(4), 638-640.

PRVULOVIC, D. - HAMPEL H, PANTEL J. Galantamine for Alzheimer's disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010, **6**(3), 345-354.

QIAN, Z.M. – KE, Y. Huperzine A: is it an effective disease-modifying drug for Alzheimer's disease? *Front Aging Neurosci*. 2014**, 6**, 216.

RAFFAELLI, A. – SABA, A. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2003, **22**(5), 318-331.

RAKONCZAY, Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biol. Hung*. 2003, **54**(2), 183-189.

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.

RODRIGUEZ-FRANCO, M.I. - FERNANDEZ-BACHILLER, M.I. – PEREZ, C. - HERNANDEZ-LEDESMA, B. – BARTOLOME, B. Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties. *J Med Chem*. 2006, **49**(2), 459–462.

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.

ROSINI, M. – ANDRISANO, V. – BARTOLINI, M. – BOLOGNESI, M.L. – HRELIA, P. – MINARINI, A. – TAROZZI, A. – MELCHIORRE, C. Rational approach to discover multipotent anti-Alzheimer drugs. *J Med Chem.* 2005, **48**(2), 360–363.

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.

ROUSU, T. – HERTTUAINEN, J. – TOLONEN, A. Comparison of triple quadrupole, hybrid linear ion trap triple quadrupole, time-of-flight and LTQ-Orbitrap mass spectrometers in drug discovery phase metabolite screening and identification in vitro amitriptyline and verapamil as model compounds. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010, **24**(7), 939-957.

RUTA, J. – ZURLINO, D. – GRIVEL, C. – HEINISCH, S. – VEUTHEYM J.L. – GUILLARME, D. Evaluation of columns packed with shell particles with compounds of pharmaceutical interest. *J Chromatogr A*. 2012, **1228**, 221-231

SABBAGH, M.N. - RICHARDSON, S. - RELKIN, N. Disease-modifying approaches to Alzheimer's disease: challenges and opportunities- lessons from donepezil therapy. *Alzheimers Dement*. 2008, **4**(1), 109-118.

SATOH, 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.

SELKOE, D.J. – HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO *Mol Med*. 2016, **8**(6), 595-608

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.

SCHILL, G. High-Performance Ion-Pair Chromatography. *J Biochem Bioph Meth*. 1989, **18**, 249-270.

SCHWARTZ, J.C. – SENKO, M.W. – SYKA, J.E. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2002, **13**(6), 659-669.

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. – TREJTNAR, 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.

SOUVERAIN, S. - RUDAZ, S. - VEUTHEY, J-L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCIMS with off-line and on-line extraction procedures. *J Chromatogr A.* 2004, **1058**, 61–66.

SPAGGIARI, D. – GEISER, L. – RUDAZ, S. Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry for in-vitro drug-metabolism studies. *Trends Analyt Chem*. 2014, **63**, 129-139.

SPERLING, R.A. – AISEN, P.S. – BECKETT, L.A. – BENNETT, D.A. – CRAFT, S. et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011, **7**(3), 280–292.

STOLZ, A. – JOOß, K. – HÖCKER, O. – RÖMER, J. – SCHLECHT, J. – NEUSÜß, C. Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: Instrumentation, methodology and applications. *Electrophoresis*. 2019, **40**(1), 79-112.

STRUPID, K. - SCHEIBNER, O. - BROMIRSKI, M. High-Resolution, Accurate-Mass Orbitrap Mass Spectrometry – Definitions, Opportunities, and Advantages. *Thermo Fisher Scientific Technical Note.* 2016, **64287**.

SWARTZ, M. HPLC detectors: a brief review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2010, **33**, 1130-1150.

TAFLIN, D.C – WARD, T.L. – DAVIS, E.J. Electrified Droplet Fission and the Rayleigh Limit. *Langmuir*. 1989, **5**, 376-384.

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.

TANG, Y.Q. – WENG, N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanal*. 2013, **5**(12), 1583-1598.

TANZI, R.E. - BERTRAM, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell*. 2005, **120**(4), 545–555

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.

TAYEB, H.O. - YANG, H.D. - PRICE, B.H. - TARAZI, F.I. Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: beyond cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2012, **134**(1), 8-25.

TODA, N. – KANEKO, T. – KOGEN, H. Development of an efficient therapeutic agent for Alzheimer's disease: design and synthesis of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2010, **58**(3), 273–287.

TODA, N. – TAGO, K. – MARUMOTO, S. – TAKAMI, K. – ORI, M. – YAMADA, N. – KOYAMA, K. – NARUTO, S. – ABE, K. – YAMAZAKI, R. – HARA, T. – AOYAGI, A. – ABE, Y. – KANEKO, T. – KOGEN, H. Design, synthesis and structureactivity relationships of dual inhibitors of acetylcholinesterase and serotonin transporter as potential agents for Alzheimer's disease. *Bioorg Med Chem*. 2003, **11**, 1935–1955.

TSUKADA, H. - SATO, K. - KAKIUCHI, T. - NISHIYAMA, S. Age-related impairment of coupling mechanism between neuronal activation and functional cerebral blood flow response was restored by cholinesterase inhibition: PET study with microdialysis in the awake monkey brain. *Brain Res*. 2000, **857**(1-2), 158–164.

UM, J.W. – NYGAARD, H.B. – HEISS, J.K. – KOSTYLEV, M.A. – STAGI, M. – VORTMEYER, A. – WISNIEWSKI, T. – GUNTHER, E.C. – STRITTMATTER, S.M. Alzheimer amyloid-beta oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nat Neurosci*. 2012, **15**(9), 1227–1235.

VALIS, M. - MASOPUST, J. - VYSATA, O. - HORT, J. - DOLEZAL, R. - TOMEK, J. - MISIK, J. - KUCA, K. – KARASOVA, J.Z. Concentration of donepezil in the cerebrospinal fluid of AD patients: evaluation of dosage sufficiency in standard treatment strategy. *Neurotox Res*. 2017, **31**(1), 162–168.

VAN EECKHAUT, A. – LANCKMANS, K. – SARRE, S. – SMOLDERS, I. – MICHOTTE, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2009, **877**(23), 2198-2207.

VYHNÁLEK, M. – LACZO, J. – NIKOLAI, T. – SHEARDOVA, K. – HORT, J. Early diagnosis of Alzheimer's disease in the light of new diagnostic criteria. *Neurol. Praxi*. 2012, **13**(6), 325-329

WANG, B.S. - WANG, H. - WEI, Z.H. - SONG, Y.Y. - ZHANG, L. - CHEN, H.Z. Efficacy and safety of natural acetylcholinesterase inhibitor huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease: An updated meta-analysis. *J. Neural. Transmission*. 2009, **116**(4), 457-465.

WANG, R. – REDDY, P.H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2017, **57**(4), 1041-1048

WANG, X. – LI, M. – RUSTUM, A.M. Thermally induced intramolecular oxygen migration of N-oxides in atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010, **24**(19), 2805-2811.

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

WILM, M. Principles of electrospray ionization. *Mol Cell Proteomics*. 2011, **10**(7), M111.009407

WOLFE, M.S. *Alzheimer's Disease II. Topics in Medicinal Chemistry (book 24)*, Springer, 2017. ISBN 978-3-319-59459-0

XING, S.H. – ZHU, C.X. – ZHANG, R. – AN, L. Huperzine a in the treatment of Alzheimer's disease and vascular dementia: a meta-analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014, **2014**, 363985.

YAARI, R. – FLEISCHER, A.S. – TARIOT, P.N. Updates to Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease. *Prim Care Companion CNS Disord*. 2011, **13**(5): pii: PCC.11f01262.

YAMAOKA, K. – NAKAGAWA, T. – UNO, T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1978, **6**, 547–558.

YANG, G. – WANG, Y. – TIAN, J. – LIU, J.P. Huperzine A for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *PLoS One*. 2013, **8**(9), e74916.

ZELENY, J. Instability of electrified liquid surfaces. *Phys. Rev.* 1917, **10**, 1–6.

ZHANG, D. – SURAPANENI, S. *ADME-enabling technologies in drug design and development*. Wiley, 2012. ISBN: 978-0-4705-4278-1

ZHANG, J. – CHEN, Z. Metal-organic frameworks as stationary phase for application in chromatographic separation. *J Chromatogr A*. 2017, **1530**, 1-18.

ZHANG, K. - KURITA, K.L. - VENKATRAMANI, C. – RUSSELL, D. Seeking universal detectors for analytical characterizations. *J Pharm Biomed Anal*. 2019, **162**, 192-204.

ZUBAREV, R.A. – MAKAROV, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem*. 2013, **85**, 5288−5296

8 PŘÍLOHY

8.1 PŘÍLOHA Č. 1

MZIK, M. – KORABECNY, J. – NEPOVIMOVA, E. – VOŘÍŠEK, V. – PALIČKA, V. – KUCA, 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_{2016} = 2,603**

8.2 PŘÍLOHA Č. 2

ZDAROVA KARASOVA, J. – **MZIK, M.** – HROCH, M. – KORABECNY, J. – NEPOVIMOVA, E. – VORISEK, V. – PALICKA, V. – KUCA, 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_{2018} = 2,452

8.3 PŘÍLOHA Č. 3

ZDAROVA KARASOVA, J. – SESTAK, V. – KORABECNY, J. – MEZEIOVA, E. – PALICKA, V. – KUCA, 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_{2018} = 2,813**

8.4 PŘÍLOHA Č. 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. **IF_{2018} = 4,833**

8.5 PŘÍLOHA Č. 5

MZIK, M. – KARASOVA ZDAROVA, J. – CHALUPOVA, K. – KORABECNY, J. – PALICKA, 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_{2018} = 2,983**