

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2022

Bc. Kateřina Krupicová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Farmakokinetické vlastnosti (ADME) nových
chemických látek, studium zaměřené na
propustnost derivátů triterpenů**

Diplomová práce

Bc. Kateřina Krupicová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Lišková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Kateřina KRUPICOVÁ
Osobní číslo: R20909
Studijní program: N1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Farmakokinetické vlastnosti (ADME) nových chemických látek, studium zaměřené na propustnost derivátů triterpenů
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

1. Cílem práce je rozšířit si vědomosti získané během bakalářské práce o ADME (absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování) vlastnostech studovaných látek neboli určit stabilitu a permeabilitu studovaných látek.
2. Právě studium propustnosti (pasivní i aktivní transport) bude hlavním bodem teoretické a praktické části diplomové práce.
3. V rámci teoretické části práce bude vypracována rešerše zaměřená na téma diplomové práce.
4. Praktická část bude obsahovat metody stanovující např. chemickou, plasmatickou a mikrosomální stabilitu, dále pak určení vazby na plasmatické proteiny, model pasivní difúze a aktivního transportu.
5. Otestování látek (potenciálních léčiv) danými metodami a shrnutí výsledků.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Volpe D.A. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.21010
- [2] Volpe D.A. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Med. Chem.* (2011) 3(16), 2063-2077
- [3] Wang Q., Rager J.D., Weinstein K., Kardos P.S., Dobson G.L., Li J., Hidalgo L.J. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics* 288 (2005) 349-359
- [4] Himanshu R., Jakir P., Pradnya H., Suneel P., Rahul S. The impact of permeability enhancers on assessment for monolayer of colon adenocarcinoma cell line (Caco-2) used in *in vitro* permeability assay. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*; 2013, 3(3), 20-29
- [5] Fan J., De Lannoy I.A. Pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol.* 2014; 87:93-120.
- [6] Vrbanc J., Slaughter R. ADME in drug discovery. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development.* 2013 by Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387815-1.00002-2>

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Barbora Lišková, Ph.D.**
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 20. října 2020
Termín odevzdání diplomové práce: ~~31. července 2021~~
31-07-2022

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY
L.S. Stechátelů 17, 781 71 Olomouc – Hrabůvka
tel: +420 585 631 901


prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 20. října 2020

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE:

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Krupicová
Název práce	Farmakokinetické vlastnosti (ADME) nových chemických látek, studium zaměřené na propustnost derivátů triterpenů.
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny
Vedoucí práce	Mgr. Barbora Lišková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022
Klíčová slova	Farmakokinetika, ADME, propustnost, MDCK-MDR1 a Caco-2 buněčné linie, triterpeny
Počet stran	70
Počet příloh	0
Jazyk	Český

SOUHRN

Triterpeny jsou pro svou biologickou a cytotoxickou aktivitu intenzivně studovanou skupinou přírodních látek. Vlastní mechanismus účinků je velmi různorodý a dílčí skupiny působí na rozličné procesy v buňce, například mění expresi proteinů, indukují buněčnou smrt nebo inhibují pro replikaci důležité enzymy a další. Diplomová práce hodnotí farmakokinetické vlastnosti nově syntetizovaných derivátů triterpenů, jakožto potenciálních léčiv vykazujících optimálně lepší stabilitu a biologickou dostupnost ve srovnání s jejich přírodními analogy. V rámci testování byly využity *in vitro* metody charakterizující ADME (absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování) vlastnosti studovaných látek. Právě studium propustnosti (pasivní i aktivní transport) bylo hlavním bodem teoretické a praktické části práce. Ke stanovení permeability derivátů přes membrány byly použity modely založené na buněčných liniích (Caco-2 a MDCK-MDR1) a umělé membrány (nebuněčná metoda PAMPA). V našich experimentech byla Caco-2 buněčná linie využita jako *in vitro* model pro predikci absorpce studovaných látek v gastrointestinálním traktu a MDCK-MDR1 buněčná linie jako *in vitro* model k posouzení penetrace sloučenin přes hematoencefalickou bariéru. Mimo jiné byly látky otestovány metodami stanovujícími chemickou, plazmatickou a mikrosomální stabilitu, a dále pak byla určena vazba na plazmatické proteiny.

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Author's first name and surname	Bc. Kateřina Krupicová
Title	Pharmacokinetic properties (ADME) of o new chemical substances, study focused on the permeability of triterpene derivatives.
Type of thesis:	Master
Department	Institute of melocular and translation medicine
Supervisor	Mgr. Barbora Lišková, Ph.D
The year of presentation	2022
Keywords	Pharmacokinetic, ADME, Permeability, MDCK-MDR1 a Caco-2 Cell Lines, Triterpenes
Number of pages	70
Number of appendices	0
Language	Czech

SUMMARY

Triterpenes, a group of natural substances, are studied for their biological and cytotoxic activity. The mechanism of action is very diverse, and the subgroups affect various processes in the cell, such as altering protein expression, inducing cell death, or inhibiting important enzymes for replication, and more. The present master thesis evaluates the pharmacokinetic properties of newly synthesized triterpene derivatives as potential drugs, showing optimally better stability and bioavailability compared to their natural analogs. *In vitro* methods characterizing ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) properties of studied compounds were used for testing. The study of permeability (passive and active transport) was the main aim of the theoretical and practical part of the thesis. Cell line-based models (Caco-2 and MDCK-MDR1) and artificial membranes (non-cellular PAMPA method) were used to determine the permeability of derivatives across membranes. In our experiments, the Caco-2 cell line was used as an *in vitro* model to predict the absorption of studied substances in the gastrointestinal tract and the MDCK-MDR1 cell line was used as an *in vitro* model to assess the penetration of compounds across the blood-brain barrier. The substances were tested, among other things, by methods determining chemical, plasma, and microsomal stability, and subsequently, the plasma protein binding was determined.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Barbory Liškové, Ph.D. a za použití literatury, která je v práci řádně citována. Veškeré literární prameny a informace, ze kterých jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.“

V Olomouci dne:

.....

Bc. Kateřina Krupicová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Barboře Liškové, Ph.D., nejen za možnost vypracování práce pod jejím vedením, za poskytnutí cenných informací a odborných konzultací, ale také za přátelský přístup, odborný dohled a pomoc při práci v laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své nejmilejší rodině a blízkým za podporu, které se mi od nich dostávalo v průběhu celého studia, čehož si nadmíru vážím.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Farmakologie	3
3.1.1	Farmakokinetika	3
3.1.1.1	ADME.....	4
3.2	Studium permeability látek	5
3.2.1	Typy transportu.....	6
3.2.1.1	Pasivní transport	6
3.2.1.2	Transport zprostředkovaný přenašečem	7
3.2.1.3	Transcytóza.....	11
3.2.2	Mnohočetná léková rezistence (MDR; multidrug rezistance).....	11
3.3	Preklinická studie permeability s využitím <i>in vitro</i> modelů	12
3.3.1	Model pasivní difúze PAMPA	13
3.3.2	Buněčné linie	14
3.3.2.1	Caco-2 buněčná linie jako model gastrointestinálního traktu.....	15
3.3.2.2	MDR1-MDCK buněčná linie jako model hematoencefalické bariéry	18
3.4	Triterpeny	20
3.4.1	Zástupci přírodních triterpenů	21
3.4.2	Deriváty triterpenů.....	22
3.5	Analýza vzorků s využitím RF – MS/MS systému.....	24
4	MATERIÁL A METODY	26
4.1	Materiál	26
4.1.1	Biologický materiál	26
4.1.2	Použité chemikálie.....	26
4.1.3	Použité roztoky	27
4.1.4	Použité soupravy.....	27
4.1.5	Použité přístroje a zařízení	28
4.2	Použité experimentální metody.....	28
4.2.1	MS/MS přechody studovaných látek a použitá RF metoda	28
4.2.2	Chemická stabilita	29
4.2.3	Plazmatická stabilita	30
4.3.4	Vazba na plazmatické bílkoviny.....	30
4.3.5	Mikrosomální stabilita	31
4.3.6	Model pasivní difúze PAMPA	32
4.3.7	Test s Caco-2 a MDCK-MDR1 buněčnými liniemi.....	33
5	VÝSLEDKY	38
5.1	Chemická stabilita.....	38

5.2	Plazmatická stabilita a vazba na plazmatické proteiny	38
5.3	Mikrosomální stabilita	40
5.4	Model pasivní difúze PAMPA	41
5.5	Testy s Caco-2 a MDCK-MDR1 buněčnými liniemi	42
5.6	Statistické hodnocení dat	43
6	DISKUSE	44
7	ZÁVĚR	50
8	LITERATURA	51

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABC	Transportní membránový protein vázající ATP (ATP-binding cassette)
ACN	Acetonitril
ADME	Absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece
ADMET	Absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece a toxicita
ADP	Adenosindifosfát
ARF	Apoptogenní faktor (Alternative reading frame)
ATP	Adenosintrifosfát
BBB	Hematoencefalická bariéra (Blood-brain barrier)
BCRP	ABC transportér (Breast cancer resistance protein)
Caco-2	Buněčná linie odvozená z lidského adenokarcinomu tlustého střeva
CE	Kolizní energie
Cl_{int}	Vnitřní clearance
CLSM	Konfokální laserová skenovací mikroskopie
CNS	Centrální nervová soustava
CO₂	Oxid uhličitý
CXP	Výstupní potenciál kolizní cely
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
C4	HPLC kolona s reverzní fází C4
DMEM	Kultivační médium (Dulbecco's modified eagle's medium)
DMSO	Dimetylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DP	Deklasterizační potenciál
ER	Efluxní poměr
FBS	Fetální bovinní sérum
fu	Množství volné frakce
gp41	Virový glykoprotein
HBSS	Transportní médium (Hanks' balanced salt solution)
HIV	Virus lidského imunodeficitu (Human immunodeficiency virus)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HTS	Vysoko-kapacitní systém (High throughput screening)
IS	Interní standard
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
MDCK	Buněčná linie odvozená ze psích buněk ledvin (Madin-Darby Canine Kidney)
MDR	Mnohočetná léková rezistence (Multidrug resistance)

MDR1	Gen (Multidrug resistance 1)
MEM	Minimální esenciální médium
MeOH	Metanol
MRM	Sledování produktu rozpadu molekulového iontu (Multiple reaction monitoring)
MRP	ABC transportér (Multidrug resistance-associated protein)
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	Poměr hmotnosti k náboji
NADP	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát redukováná forma
NBD	Doména vázající nukleotidy
OAT	Transportéry organických aniontů (Organic anion transporters)
OATP	Polypeptidy transportující organické anionty (organic anion transporting polypeptide)
OCT	Transportéry organických kationtů (Organic cation transporter)
PAMPA	<i>In vitro</i> model pasivní difúze (Parallel artificial membrane permeability assay)
Papp	Relativní permeabilita
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate buffered saline)
PEPT	Peptidový transportér
P-gp	P-glykoprotein
P450	Enzymy cytochromu P450
RED test	Test rychlé rovnovážné dialýzy (Rapid equilibrium dialysis)
RF	RapidFire
RF-MS/MS	RapidFire ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
RFU	Relativní fluorescence (Relative fluorescence units)
RPM	Otáčky za minutu
SAR	Analýza vztahu struktury a aktivity (Structure activity relationship analysis)
SLC	Rodina transportních proteinů „solute carrier“
SPE	Extrakce na pevné fázi
TEER	Transepiteliální elektrická rezistence
TMD	Transmembránová doména
UMTM	Ústav molekulární a translační medicíny v Olomouci

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Základní farmakokinetické děje.....	4
Obrázek 2: Schématické znázornění střevního epitelu a čtyř různých transportních mechanismů.....	6
Obrázek 3: Subcelulární lokalizace vybraných uptake a eflux transportních proteinů v enterocytech..	8
Obrázek 4: Schématické znázornění principu funkce ABC transportérů.....	9
Obrázek 5: Schématicky znázorněná struktura vybraných ABC efluxních transportérů.....	9
Obrázek 6: Model sekundární struktury P-gp/ABCB1 efluxního transportéru.....	11
Obrázek 7: Možné buněčné mechanismy vzniku rezistence v nádorových buňkách.....	12
Obrázek 8: Schématické znázornění uspořádání akceptorové a donorové části desky.....	13
Obrázek 9: Porovnání testů permeability s využitím modelu Caco-2 buněčné linie a in vitro modelu PAMPA.....	14
Obrázek 10: Transmisní elektronová mikrofotografie apikální části buněk Caco-2 a mikrofotografie kryosekce monovrstvy intestinálních epitelálních buněk.....	16
Obrázek 11: Lokalizace P-gp transportérů v Caco-2 buňkách.....	17
Obrázek 12: Subcelulární lokalizace efluxních ABC transportérů v polarizovaných buňkách ledvin.....	18
Obrázek 13: Schématické znázornění transportních mechanismů BBB.....	20
Obrázek 14: Hematoencefalická bariéra.....	20
Obrázek 15: Chemická struktura izoprenu.....	21
Obrázek 16: Chemická struktura vybraných cyklických triterpenů.....	21
Obrázek 17: Vzorec kyseliny betulinové (kyselina 3 β -hydroxy-lup-20 (29)-en-28-ová).....	23
Obrázek 18: Schematicky znázorněný princip RF – MS/MS systému.....	24
Obrázek 19: Schéma distribuce jednotlivých roztoků v jamkách při transportní studii.....	35
Obrázek 20: Graf závislosti relativní koncentrace (%) studovaných triterpenů na době inkubace (min) ve fosfátovém pufru.....	38
Obrázek 21: Graf relativní koncentrace (%) studovaných triterpenů na době inkubace (min) ve 100% lidské plazmě.....	39
Obrázek 22: Graf závislosti relativní koncentrace (%) studovaných triterpenů na době inkubace (min) v přítomnosti jaterních mikrosomů.....	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled efluxních ABC transportérů identifikovaných ve střevě z pohledu jejich lokalizace, substrátové specifity, substrátů a inhibitorů.....	10
Tabulka 2: Srovnání charakteristik Caco-2 a MDCK buněčných linií.....	19
Tabulka 3: Parametry nalezené při optimalizaci hmotnostně spektrometrické detekce látky LEM00023578.	29
Tabulka 4: Kompletní data plazmatické stability pro látku LEM00023566.	39
Tabulka 5: Procento vázané frakce studovaných triterpenů na bílkoviny plazmy.	40
Tabulka 6: Relativní permeabilita a příslušné kategorie propustnosti studovaných triterpenů skrze uměle vyrobenou membránu.....	42
Tabulka 7: Zdánlivý koeficient propustnosti, příslušná kategorie a efluxní poměr studovaných triterpenů testovaných v experimentech s Caco-2 a MDCK-MDR1 buňkami.	43
Tabulka 8: Vyhodnocení ADME vlastností nově syntetizovaných derivátů triterpenů.....	45

1 ÚVOD

Preklinické hodnocení nových chemických sloučenin se stalo nezbytnou součástí výzkumu a vývoje nových léčiv. Cílem je především vyhodnotit jednotlivé fáze osudu látek v živém organismu a identifikovat tak eventuální nežádoucí účinky na tělo. Kvůli nepříjemným farmakokinetickým a toxickým vlastnostem selhává množství klinicky testovaných sloučenin. Je tedy velmi důležité mít z preklinického testování spolehlivé výsledky s vysokou prediktivní hodnotou, aby bylo možné vybrat co nejvhodnější kandidáty pro vývoj nových léčiv. Proto výhradně jen ty látky, které úspěšně projdou všemi fázemi preklinického studia, a vykazují tak určité vlastnosti a stabilitu, postupují dále do fáze vlastního klinického hodnocení. Nakonec pouze malá část z nich je na základě otestovaného terapeutického potenciálu využita jako léčiva při léčbě různých onemocnění.

Farmakokinetika látek *in vivo* závisí mimo jiné i na stupni propustnosti. Transport přes buněčné membrány je tak jedním z významných parametrů ovlivňující ADME vlastnosti látek. Aby bylo léčivo schopné docílit svého místa účinku a následně se eliminovat z těla, musí překonat tuto přirozenou bariéru. Transmembránový přenos látek může být zprostředkovaný jednak pasivní difúzí, jež je řízena koncentračním gradientem, jednak transportními mechanismy využívajícími specifické membránové proteiny, a v neposlední řadě transcytózou.

Transportéry exprimované v membránách buněk polarizovaných tkáních svou funkční aktivitou ovlivňují absorpci, distribuci a exkreci řady sloučenin, a to včetně klinicky důležitých léčiv. Mezi vůbec nejvíce studované zástupce patří ABC efluxní transportéry (P-gp, MRP a BCRP) regulující aktivní transport látek z buněk do extracelulárního prostoru. Obyčejně bývají exprimovány jak v normálních, tak i v nádorových buňkách, kde pravděpodobně v důsledku své zvýšené exprese přispívají ke vzniku mnohočetné lékové rezistence (MDR) vůči účinkům cytostatických léčiv. Klinicky nejvýznamnější P-gp transportér exprimovaný na apikálním povrchu enterocytů omezuje perorální absorpci mnoha hydrofobních a strukturně nepříbuzných substrátů. V membránách endoteliálních mozkových buněk pak tvoří důležitou složku hematoencefalické bariéry a brání tak vstupu potenciálně nebezpečných sloučenin do CNS.

2 CÍLE PRÁCE

Předložená diplomová práce je složena z teoretické a praktické části. V rámci teoretické části je vypracovaný literární přehled zaměřený na studium farmakokinetických vlastností látek v preklinickém vývoji léčiv. V literárním přehledu je pak probírána především problematika propustnosti látek přes membrány, počítaje jejich pasivní i aktivní transportní mechanismy.

Cílem praktické části je hodnocení ADME vlastností sady tří nově syntetizovaných derivátů triterpenů majících eventuálně lepší terapeutické účinky, a naopak méně účinků vedlejších, oproti jejich přírodním analogům. Součástí práce je aplikace *in vitro* metod stanovujících stabilitu testovaných derivátů ve fosfátovém pufru, lidské plazmě a v přítomnosti jaterních mikrosomů. Je stanovena vazba látek na bílkoviny plazmy. V neposlední řadě je prostřednictvím buněčných linií, Caco-2 a MDCK-MDR1, a nebuněčné metody PAMPA testována schopnost látek procházet určitou vrstvou (buněčnou membránou).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Farmakologie

Farmakologie představuje vědní obor zabývající se výzkumem léčiv a chemických sloučenin jakožto nových potenciálních terapeutik. Jejímž předmětem zájmu je jak studium účinků látek na živý organismus, tak osud těchto látek v těle po jejich podání. Farmakologie je tak rozdělena do dvou odlišných domén, samostatných, ale interaktivních domén dynamiky a kinetiky [Vrbanac a Slauter, 2013].

Farmakodynamika je studium vztahů mezi koncentrací xenobiotik v místě jejich působení, kde se nacházejí odpovídající terapeutické cíle (receptory, enzymy, transportéry), a farmakologické odpovědi [Fan a De Lannoy, 2014]. Jak je uvedeno v publikaci Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (2006): „Stejně jako tělo reaguje na lék, tak působí i daná látka na tělo. Jedná se o interakce, pro které je klíčový koncept vazby léčiva na receptor, který je zodpovědný za selektivitu účinku léčiva a také za kvantitativní vztah mezi léčivem a účinkem. Tyto mechanismy působení léčiva na organismus jsou tedy procesy farmakodynamiky“ [Goodman L. a kol., 2006].

Farmakokinetika je disciplína, která se naopak zabývá působením organismu na léčivo [Fan a De Lannoy, 2014]. Jakmile léčivo vstoupí do těla, musí být absorbováno z místa podání do systémového oběhu. Následně poté je pomocí cév oběhového a lymfatického systému distribuováno do tkání. Látka přitom na cestě do svého cílového místa musí překonat množství biologických bariér a být podrobena biotransformaci, tedy enzymatickému štěpení léčiva na metabolity, které jsou pak vyloučeny z těla ven prostřednictvím moči a/nebo žluči. Absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování (ADME) jsou základní procesy, které ovlivňují *in vivo* farmakokinetiku sloučenin [Lin a kol., 2003].

Oba studijní obory kinetiky a dynamiky jsou důležité pro studium farmakologické účinnosti chemických sloučenin v těle a mohou být ovlivněny jak experimentálními, tak i klinickými podmínkami (např. pohlaví, věk, chorobný stav apod.) [Abdel-Rahman a Kauffman, 2004].

3.1.1 Farmakokinetika

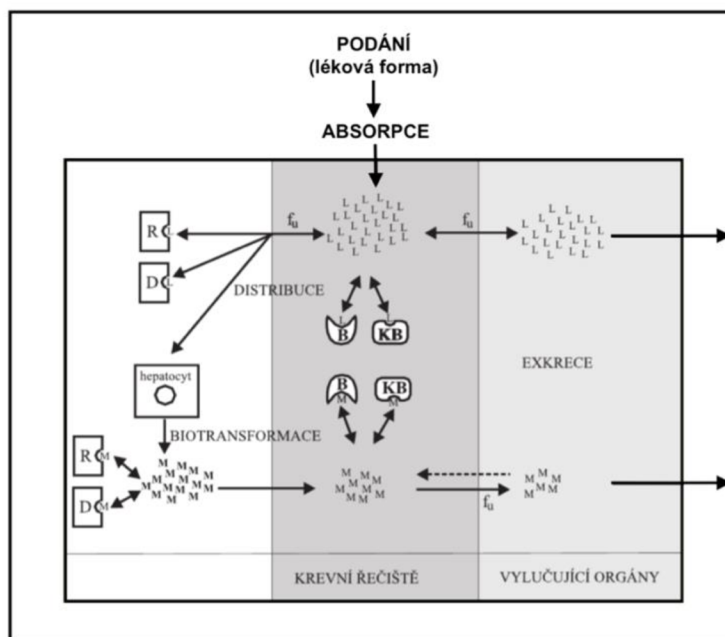
Farmakokinetika v širším slova smyslu zahrnuje kinetické vztahy koncentrace a času, kinetiku chemické reakce a tvorbu nových chemických struktur, tedy metabolitů léčiv [Vrbanac a Slauter, 2013]. Farmakokinetické metody pak vypracovávají vhodné matematické modely pro vystihnutí časové závislosti pohybu léčiva v živém organismu.

Ranná charakteristika farmakokinetických vlastností studovaných látek se stala rutinní součástí aplikovaného výzkumu v programu preklinického vývoje [Lin a Lu, 1997]. Hlavním cílem je vyhodnotit vlastnosti a jednotlivé fáze osudu nové studované látky v živém organismu a identifikovat tak eventuální nežádoucí a toxické účinky [Součková a kol., 2015]. Klíčovými atributy nové chemické entity, jakožto sloučeniny potenciálního zájmu, jsou dostatečná farmakologická aktivita (účinnost a selektivita)

a současně dobré vlastnosti ADME i toxicity (ADMET) [Fan a De Lannoy, 2014]. Porozuměním časového průběhu léčiva v těle se proto zvyšuje pravděpodobnost léčebného účinku, a tedy i potenciál pro vlastní klinické užití. K dosažení těchto cílů bylo potřeba značného pokroku v metodách používaných pro preklinické hodnocení ADME, díky nimž lze dnes už mnohem snadněji předvídat chování nových sloučenin v biologickém systému [Smith a van de Waterbeemd, 1999]. Nedostatečná účinnost *in vivo* lze například přičíst nežádoucím farmakokinetickým vlastnostem, jako je špatná absorpce látky z místa podání a krátký biologický poločas. Toxicita potom může být důsledkem samotné škodlivé molekuly nebo tvorby reaktivních metabolitů [Lin a kol., 2003].

3.1.1.1 ADME

Akronym ADME, tedy absorpce, distribuce, metabolismus a eliminace, vyjadřuje povahu sloučeniny v organismu (obr. 1). Jedná se o zcela odlišné, i když v mnoha ohledech vzájemně související procesy probíhající mezi podáním a vyloučením sloučeniny z těla [Lin a kol., 2003]. Pro dosažení účinku, ať už terapeutického nebo toxického, se tedy sloučenina či její aktivní metabolity musí dostat ke svému cílovému místu působení, a to zejména v dostatečné koncentraci. Koncentrace léčiva v cílovém místě však není dána pouze samotnou dávkou podání, ale především závisí na ADME vlastnostech [Fan a De Lannoy, 2014]. Pokud tedy není chemická látka vhodně přijata do těla, distribuována do správných tkání a orgánů, metabolizována vhodným způsobem, který okamžitě neodstraňuje její aktivitu, a následně vhodným způsobem eliminována z těla ven, nemůže být ona látka léčivem bez ohledu na to, jak aktivní nebo specifická její činnost je [Hodgson, 2001].



Obrázek 1: Základní farmakokinetické děje. R – receptor, D – depo, KB – krevní buňky, B – bílkovina, L – léčivo, M – metabolit, f_u – volná nevázaná frakce [upraveno dle Martínková, 2007].

Jednotlivé ADME fáze osudu látek v organismu byly podrobněji popsány v mé bakalářské práci „Kateřina Krupicová. (2020): Studium základních farmakokinetických vlastností nových léčiv v rámci preklinického vývoje“. V dalších kapitolách literárního přehledu bude rozebrána otázka schopnosti látky procházet určitou vrstvou (buněčnou membránou), resp. jejich permeability, čemuž se věnuje i zčásti experimentální část této práce.

3.2 Studium permeability látek

Podání léku pacientovi lze hned několika různými způsoby, avšak v medicíně je díky své snadné aplikaci a neinvazivnosti nejvíce používaná metoda perorálního podávání léků. Aby sloučenina splňovala požadavky perorálního produktu, musí být nejen farmakologicky aktivní, ale taktéž by měla být schopna dosáhnout svého cílového místa a vykazovat tak určitou permeabilitu v gastrointestinálním traktu [Volpe, 2011]. V rámci preklinické fáze objevování nových léčiv tak dochází k paralelnímu hodnocení farmakologické účinnosti a základních farmakokinetických vlastností nových kandidátních léčiv a nabyté informace pak předpovídají terapeutický účinek látek v živém organismu [Carlson a Fisher, 2008].

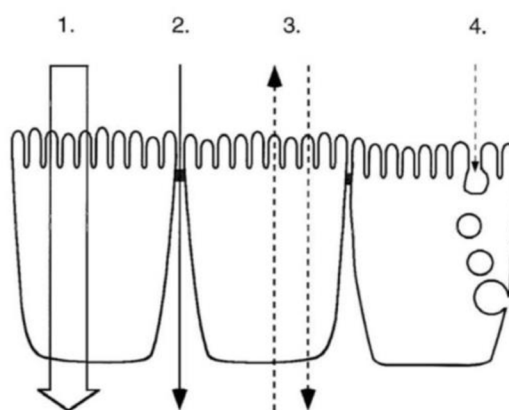
Ve farmakokinetice absorpce představuje přenos xenobiotika z místa jeho podání až do krve [Rowland a Tozer, 1995]. Primárním orgánem odpovědným za vstřebávání živin, a tedy i perorálně užívaných léčiv, je tenké střevo. Enterocyty, epiteliální buňky tenkého střeva, vytvářející fyzickou a biologickou intestinální bariéru produkují množství enzymů a transportérů, jež mohou mít významný vliv na farmakokinetiku jimi přenášených léčiv [van Breemen a Li, 2005].

Plazmatická membrána enterocytů je organizována do dvou odlišných domén, apikální a bazolaterální, jež se liší svou strukturou a transportními vlastnostmi. Takové buňky jsou označovány jako buňky polarizované [Dressman a kol., 2008]. Udržení buněčné polarity je nezbytné nejen pro zachování integrity epitelové bariéry. Apikální část membrány polarizované buňky se nachází na povrchu a je specializovaná zejména pro absorpci. Vybihají z ní hustě uspořádané mikrokilky vytvářející tzv. kartáčový lem, jež mnohonásobně zvětšují absorpční povrch a slouží tak jako difúzní bariéra bránící přímému kontaktu cizích částic s apikálním epitelem. Do monovrstvy vstřebané molekuly následně putují k transportním epiteliálním proteinům umístěným v bazolaterální membráně. Prostřednictvím transportérů jsou pak látky vyloučeny ven, v případě enterocytů tedy do krevního oběhu [Snoeck a kol., 2005].

Rychlost a rozsah střevní absorpce závisí zejména na fyzikálně – chemických vlastnostech studované látky (rozpuštěnost, velikost, náboj), fyziologických faktorech (vyprazdňování žaludku, permeabilita membrány) a biochemických procesech (metabolismus). O absorpci neuvažujeme v případě, že je látka podána intravenózně a je tak přenášena přímo do krevního řečiště [Lin a kol., 2003].

3.2.1 Typy transportu

Farmakokinetika xenobiotik v živém organismu závisí z velké části mimo jiné i na míře dostupnosti. Jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňující ADME vlastnosti látek je tedy jejich transport přes biologické membrány buněk. Aby léčivo bylo schopné dosáhnout svého cílového místa účinku a následně se eliminovat z těla ven, musí překonat tuto přirozenou bariéru. Intestinální bariéra se skládá z několika paralelních transportních procesů. Konečná absorpce látek přes membránu střeva je tak komplexním procesem a může být výsledkem kombinace jednoho či více ze čtyř různých typů transportů, a to pasivního paracelulárního a transcelulárního transportu, dále transportu zprostředkovaného nosičem a v neposlední řadě transcytózy (obr. 2) [Artursson a kol., 2001].



Obrázek 2: Schématické znázornění střevního epitelu. Šipky označují čtyři různé transporty léčiva: 1. pasivní transcelulární, 2. pasivní paracelulární, 3. aktivní transcelulární zprostředkovaný nosičem a za 4. transcytóza [převzato od Artursson a kol., 2001].

3.2.1.1 Pasivní transport

K nejvíce častým mechanismům transportu léčiv patří pasivní difúze přes střevní membránu, jež je řízena koncentračním gradientem. Tento samovolně probíhající proces, tedy bez dodání jakékoliv energie do systému, využívá pouze kinetickou energii mísících se molekul. Nastává ve chvíli, kdy je vysoká koncentrace látky na jedné straně membrány, zatímco v porovnání na straně druhé je koncentrace nízká. Množství přestupujícího léčiva je přímo úměrné koncentraci na druhé straně membrány s vyšší hodnotou. Pohyb léčiva zpravidla přetrvává až do vyrovnání koncentrací [Tomlin a Brown, 2010]. K pasivní absorpci dochází buďto přes buněčné membrány (transcelulární cestou), nebo přes těsné buněčné spoje enterocytů (paracelulární cestou) [Balimane a kol., 2006], jak lze vidět na obrázku č. 2. Ačkoliv se buněčné membrány liší svým obsahem lipidů, tak jsou všechny bez výjimky charakteristické přítomností fosfolipidové dvouvrstvy, a proto právě lipofilita sloučenin hraje hlavní roli při pasivní difúzi látek. Zatímco vysoce lipofilní látky velmi dobře difundují do buněčných membrán a jsou tak výhradně přenášeny prostřednictvím transcelulární difúze, hydrofilní látky přes membrány

přestupují velmi obtížně a využívají tak paracelulárního transportu mezi jednotlivými buňkami [Volpe, 2011].

3.2.1.2 Transport zprostředkovaný přenašečem

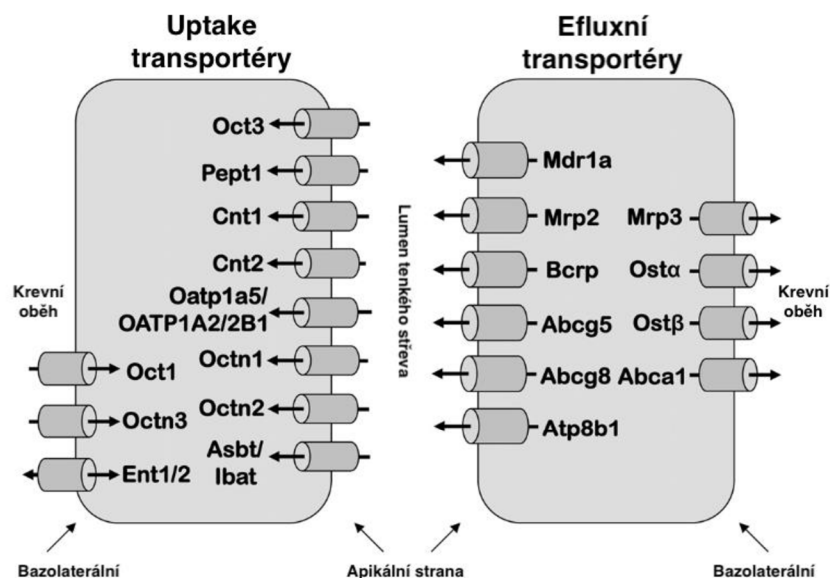
V mnoha případech, kdy jsou látky natolik velké nebo málo lipofilní, že nepronikají lipidovými membránami, je transmembránový přenos zajištěn membránovými transportními proteiny. Ukázalo se, že transportéry exprimované v membránách buněk polarizovaných tkáních svou funkční aktivitou ovlivňují absorpci, distribuci a exkreci řady substrátů, včetně klinicky důležitých léčiv, a značně tak určují jejich farmakokinetické vlastnosti. Proto tedy, aby bylo možné co nejlépe předpovědět dispozici léčiv *in vivo*, musí být jak metabolismus, tak transport u řady látek zvažovány společně [Kim, 2002]. Kromě pasivní difúze se tak na absorpci látek podílí aktivní či pasivní transportní mechanismy zprostředkované specifickými přenašeči – aktivní transport a usnadněná (facilitovaná) difúze. Permeace řízená transportérem je děj inhibovatelný a satureovatelný [Balimane a kol., 2006].

Na rozdíl od prosté difúze je s využitím usnadněné difúze nutná přítomnost membránového proteinu, jež zajistí průchod hydrofilnějších látek membránou. Společným rysem je však skutečnost, že látka postupuje membránou po koncentračním spádu, a to bez vynaložení jakékoliv energie [Hacker a kol., 2009].

Aktivní transportní mechanismus vyžaduje rovněž jako facilitovaná difúze účast specifického transportního proteinu umožňujícího průchod poměrně hydrofilních sloučenin biologickými membránami. Tento proces však na rozdíl od pasivního transportu vyžaduje dodání energie do systému, která je následně využita při transportu látek proti směru koncentračního gradientu, tedy z místa s menší koncentrací látky do míst s koncentrací vyšší. Podle zdroje energie dělíme aktivní transport na primární a sekundární [Giacomini a Sugiyama, 2011]. Primární aktivní transport je spřažen s hydrolýzou ATP a využívá tak přímo uvolněnou chemickou energii ze štěpení této makromolekuly pro výhradně jednosměrný transport látky. Během tohoto procesu se substrát váže na povrch transportního proteinu. Následně po štěpení ATP dojde ke změně konformace, která umožní uvolnění látky do okolního prostředí. V rámci sekundárního aktivního transportu pak přenašeči nevyužívají energii uvolněnou z ATP, ale hnací silou transportu je energie získaná přenosem kosubstrátu (obvykle iontu) přes membránu, a to po jeho koncentračním spádu. Takové spojení transportu s rozpuštěnými látkami přes membránu se pak nazývá kotransport, který se následně podle vzájemného směru přenášených částic dělí na symport (stejný směr) a antiport (opačný směr) [Klaassen a Aleksunes, 2010].

Transportéry se podle funkční aktivity v membráně rozdělují do dvou skupin. Ty, které regulují absorpci klíčových látek do buňky, řadíme mezi tzv. „up-take“ transportéry, a naopak na výstupu potenciálně nebezpečných látek z buňky se podílejí tzv. „eflux“ transportéry. Jednotliví zástupci obou skupin mohou být lokalizovány jak na apikální, tak na bazolaterální části membrány a jsou navíc

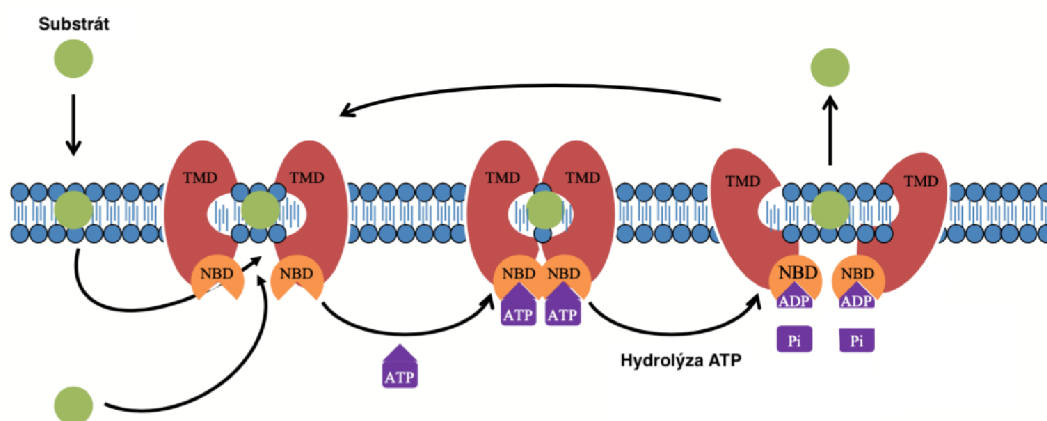
přítomny v celém organismu. Nejvýznamnější roli při dispozici léčiv v organismu však hrají transportní proteiny exprimované v membráně jater, střev a ledvin [König a kol., 2013]. Transportéry, umístěné na některých dalších významných tkáňových bariérách, počítaje hematoencefalickou bariéru, pak chrání tkáň před nežádoucími účinky některých látek.



Obrázek 3: Subcelulární lokalizace vybraných uptake a eflux transportních proteinů v enterocytech hlodavců [převzato od Klaassen a Aleksunes, 2010].

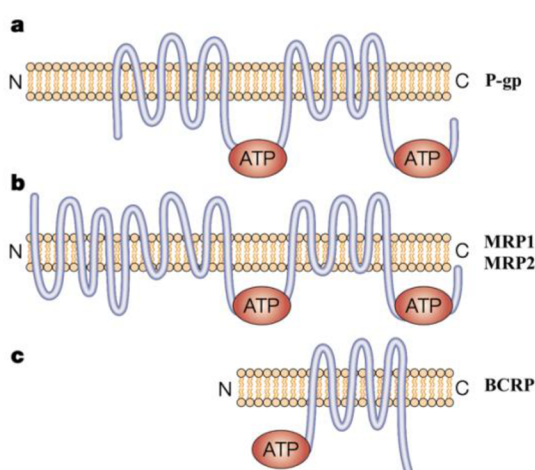
V lidském genomu je anotováno více než 400 membránových transportérů, které se z farmakokinetického pohledu primárně řadí do dvou velkých transportních nadrodin, jež se podílejí na transportu léčiv přes buněčné membrány [Giacomini a Huang, 2013]. První velkou skupinu membránových proteinů tvoří SLC (solute carrier) transportéry. Pro přenos jak exogenních, tak endogenních substrátů využívají sekundární či terciární transport a obvykle, avšak ne vždy, se považují za uptake transportéry [Klaassen a Aleksunes, 2010].

Druhou velmi strukturně i funkčně pestrou skupinu transportních proteinů představují ABC (ATP-binding cassette) transportéry typicky fungující jako efluxní pumpy [Nies a kol., 2008]. ATP- vázající kazetové transportéry jsou integrální proteiny, jež k čerpání substrátu přes membrány využívají aktivního primárního transportu [Klaassen a Aleksunes, 2010]. Všechny ve své struktuře obsahují jak dvě transmembránové domény (TMD), tak dvě domény vázající nukleotidy (NBD). NBD domény jsou vysoce konzervované proteiny s ATPázovou aktivitou sloužící jako pohonné jednotky, které váží a následně hydrolyzují ATP na ADP. Uvolněná energie je následně využita k translokaci různých substrátů. Další dvě TMD domény pak tvoří vlastní kanál pro průchod samotného substrátu (obr. 4). Nacházejí se u všech organismů, od prokaryot až po eukaryota (včetně člověka) [Kubeš a kol., 2016].



Obrázek 4: Schématické znázornění principu funkce ABC transportérů. Po navázání vhodného substrátu na transportní protein dochází ke konformační změně a uzavření substrátu mezi obě transmembránové domény. Následně navázání ATP na obě dvě NBD domény a jeho hydrolýza zprostředkuje odčerpání substrátu z cytoplazmy buněk zpět do extracelulárního prostoru a následně se obnoví stabilní konformační stav [upraveno dle Chen a kol., 2016].

V současné době mezi nejvíce studované zástupce ABC efluxních transportérů patří P-gp (P-glycoprotein), MRP (multidrug resistance-associated protein) a BCRP (breast cancer resistance protein) (tab. 1). Ve fyziologických tkáních se hojně vyskytují na apikální části cytoplazmatické membrány [Tucker a kol., 2012]. Tyto ABC transportéry jsou běžně exprimovány jak v normálních, tak i v nádorových buňkách, kde je o nich známo, že se v důsledku své zvýšené exprese mohou podílet na vzniku mnohočetné lékové rezistence vůči rozdílným protinádorovým léčivům [Gottesman a kol., 2002]. Některé látky mohou být zároveň substrátem a/nebo inhibítorem více než jednoho transportéru. Down-regulace či inhibice efluxních ABC transportérů ve střevě se využívá jako účinná strategie vedoucí ke zvýšení biologické dostupnosti substrátů [Shibayama a kol., 2011].



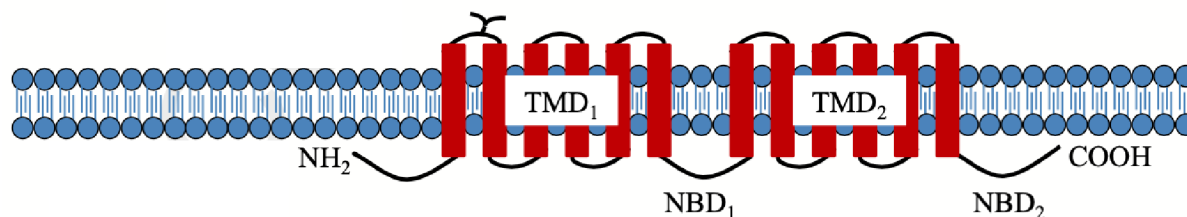
Obrázek 5: Schématicky znázorněná struktura vybraných ABC efluxních transportérů v cytoplazmatické membráně buněk [převzato od Gottesman a kol., 2002].

Tabulka 1: Přehled efluxních ABC transportérů identifikovaných ve střevě z pohledu jejich lokalizace, substrátové specifity, substrátů a inhibitorů [vypracováno dle Estudante a kol., 2013].

Transportér	Kódující gen	Lokalizace v buňce	Substrátová specifita	Substráty	Inhibitory	Polymorfismus
MDR1/P-gp	ABCB1	Apikální	Široká specifita substrátu, přednost hydrofobním nebo kationtovým molekulám	Steroidní hormony, žlučové soli, cyklosporin, digoxin, flavonoidy, aldosteron, reserpin	Verapamil, Tween 80, PEG 400, cykloextrin, grepový džus	Ano
BCRP/MXR	ABCG2	Apikální	Široká specifita substrátu, kyseliny a konjugáty léčiv	Statiny, rifampicin, fytoestrogeny, flavonoidy, porfyriny, topotekan	Estron, flavonoidy, ritonavir, tamoxifen, cyklosporin	Ano
MRP1	ABCC1	Bazální	Hydrofóbní, konjugáty s glutathionem, kyselinou glukuronovou nebo síranem	Vinca alkaloidy, antracykliny, methotrexát, etoposid, mitoxantron	Sulfinpyrazon, benzbromaron, probenecid, MK571, LTC ₄	Ne
MRP2	ABCC1	Apikální	Konjugáty s glutathionem, glukuronidem a těžkými kovy, nekonjugované organické anionty	Konjugáty žlučových solí a těžkých kovů, ochratoxin A, flavonoidy, ampicilin, konjugáty resveratrolu, epikatechin	Grepový džus, probenecid, indometacin, MK571, LTC ₄	Ano

Prvním objeveným a dnes klinicky vůbec nejvýznamějším efluxním přenašečem zprostředkující transport látek z intracelulárního do extracelulárního prostoru je P-glykoprotein [Balimane a kol., 2006]. Byl identifikován Julianem a Lingem již v roce 1976 jako 170 kDa membránový glykoprotein při výzkumu rezistence nádorových buněk na terapii [Juliano a Ling, 1976]. Lidský P-gp je kódovaný několika geny MDR, včetně *mdr1* (ABCB1) a *mdr3* (ABCB4), ačkoliv se nejčastěji označuje jako produkt genu ABCB1 [Klaassen a Aleksunes, 2010]. Oba lidské geny *mdr1* i *mdr3* jsou lokalizovány na dlouhém raménku chromozomu 7 (oblast q36) [Nosková a kol., 2000].

Jedná se o všudypřítomný transportér, který je hojně exprimován zejména na apikálním povrchu enterocytů, dále na kanalikulární membráně hepatocytů, v ledvinách na luminální straně epitelových buněk proximálního tubulu, na apikálním povrchu placenty a buněk mozkové membrány. P-gp tvoří důležitou součást hematoencefalické bariéry a vystupuje zde jako obranný mechanismus proti proniknutí toxinů a omezuje tak i vstup léků do centrálního nervového systému (CNS) [König a kol., 2013]. Četné studie prokázaly, že P-gp má širokou substrátovou specifitu s preferencí pro hydrofobní, amfipatické či kationtové molekuly [Estudante a kol., 2013]. Řada přirozeně se vyskytujících látek a důležitých klinických léků jako substrátů pro P-gp jsou uvedeny v tabulce č. 1. Díky své strategické poloze na membránových bariérách a širokému spektru substrátů je P-gp důležitým determinantem farmakokinetiky a stejně tak důležitým mediátorem lékových interakcí zprostředkovaných transportéry [König a kol., 2013]. Pro hodnocení interakce P-gp se používají různé *in vitro* a *in vivo* modely [Balimane a kol., 2006].



Obrázek 6: Model sekundární struktury P-gp/ABCB1 efluxního transportéru. TMD – transmembránové domény, NBD – doména vázající nukleotidy [převzato od Chen a kol., 2016].

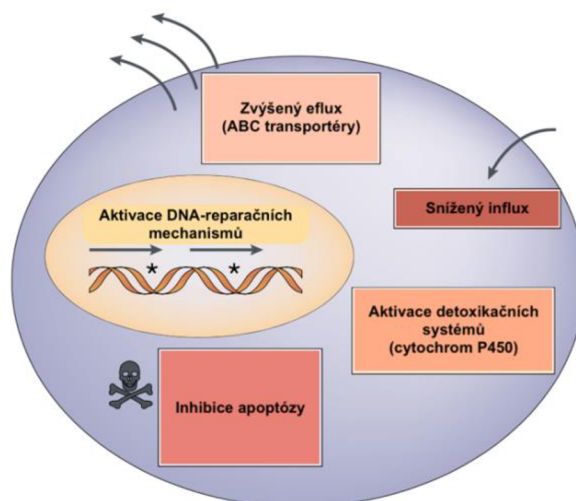
3.2.1.3 Transcytóza

Konečně by v transportu látek mohla hrát roli také transcytóza, jež představuje přenos makromolekulárních látek napříč buňkami prostřednictvím receptorem-zprostředkovaného vezikulárního transportu. Nízká transportní kapacita však limituje tento mechanismus pro transport řady léčiv, proto se více méně využívá jen pro přenos vysoce účinných látek, jako jsou peptidové antigeny, které jsou kvůli své velikosti vyloučeny z ostatních transportních cest [de Aizpurua a Russell-Jones, 1988]. Další nevýhodou je, že k transportu látek dochází v membránových vezikulách, které obsahují velké množství proteolytických enzymů. Výsledkem je značná degradace většiny exogenních proteinů během transcytozy jak in situ, tak v buněčných monovrstvách. Nicméně transcytóza makromolekul, a dokonce i menších částic, je více účinnější v M-buňkách, specializovaných epiteliálních buňkách intestinálního epitelu. Nízký počet M-buňek ve střevním epitelu ale snižuje možnost využití tohoto buněčného typu s nižší proteolytickou aktivitou jako obecné cesty pro transport léčiva epitelem [Artursson a kol., 2001].

3.2.2 Mnohočetná léková rezistence (MDR; multidrug resistance).

Jedním z nejvíce častých a relevantních faktorů omezujících úspěšnost klasické protinádorové terapie je rezistence nádorových buněk vůči účinkům cytostatických léčiv. V případě, že nádorové buňky určitého histopatologického typu mají schopnost odolávat působení cytostatik již hned při první léčbě, mluvíme o primární (přirozené) rezistenci buněk [Nosková a kol., 2000]. Však se stále efektivnější terapií se obecně stala běžnou a mnohem častější rezistence sekundární (získaná), tedy vznikající až během samotné cytostatické léčby [Gottesman, 2002].

Jak je znázorněno na obrázku č. 7, léková rezistence nádorových buněk může vznikat hned několika různými buněčnými mechanismy, které jsou komplexnější povahy. Mezi nejčastější mechanismy vzniku rezistence patří především zvýšený eflux látky z buňky a snížený influx látky do buňky, aktivace koordinovaně regulovaných detoxikačních systémů v buňce, inhibice apoptických drah, zvýšená rychlost opravy poškozené DNA léčivem, změna specifického buněčného cíle a konečně změny ve složení lipidů v buněčné membráně [Gottesman a kol., 2002].



Obrázek 7: Možné buněčné mechanismy vzniku rezistence v nádorových buňkách [upraveno dle Gottesman a kol., 2002].

Mimořádná pozornost je pak věnována fenoménu, který je známý jako mnohočetná léková rezistence (MDR), jež představuje problematický příklad rezistence získané. MDR je charakterizovaná rezistencí pozměněných buněk vůči řadě farmakologicky a strukturně nepříbuzným protinádorovým léčivům současně [Baguley, 2010]. Může tak objasňovat případy, kdy jsou některé nádory necitlivé k alternativní léčbě obsahující nové, a v původní léčbě ještě nepoužité, druhy cytostatik [Nosková a kol., 2000].

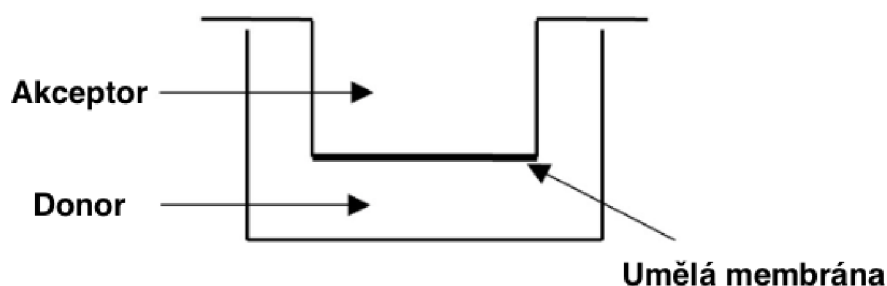
Jednou z hlavních příčin podílející se na vývoji mnohočetné lékové rezistence je především nadměrná exprese efluxních ABC transportérů v membránách nádorových buněk a taktéž detoxikačních enzymů [Chen a kol., 2016]. Zvýšený eflux či biotransformace cytostatické látky v buňce vede pak ke snížení koncentrace dané látky pod její účinnou cytotoxickou koncentraci, což významně brzdí úspěch farmakoterapie rakoviny. Vývoj nových inhibitorů efluxních transportérů by mohl překonat MDR a obnovit tak citlivost chemoterapie

3.3 Preklinická studie permeability s využitím *in vitro* modelů

Ke studiu permeability a mechanismu transportu velkého počtu látek přes epiteliální membrány máme k dispozici celou řadu *in vivo*, *in situ* a *in vitro* experimentálních modelů, jejichž kombinace se v preklinickém výzkumu rutinně využívá při hodnocení. V současné době je však ve výzkumných laboratořích čím dál tím více populární aplikace *in vitro* metod. Konkrétně se pak nejčastěji jako nástroj pro studium intestinální permeability využívají modely založené na buněčných liniích (Caco-2 či MDCK buňky), nebo umělé membrány [Balimane a kol., 2006]. Takovým příkladem může být nebuněčná metoda nazývaná PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay), jež představuje *in vitro* model pasivní difúze [Kerns a kol., 2004].

3.3.1 Model pasivní difúze PAMPA

Protokol slouží ke stanovení průniku testované látky skrze uměle vyrobené membrány, které jsou potažené lipidovým roztokem v inertním organickém rozpouštědle. Kansy a kol. jako první popsal model skládající se z donorové (spodní) a akceptorové (horní) části porézní desky mezi nimiž je umělá membrána (filtr) potažená fosfolipidovým roztokem (10% lecitin v dodekanu) [Kansy a kol., 1998]. Takové uspořádání 96-jamkových destiček vytváří systém označovaný jako „sendvič“ (obr. 8). Další modely PAMPA jsou v podstatě už jen variacemi tohoto popsaného modelu používající alternativní kombinace fosfolipidů [Dressman a kol., 2008].

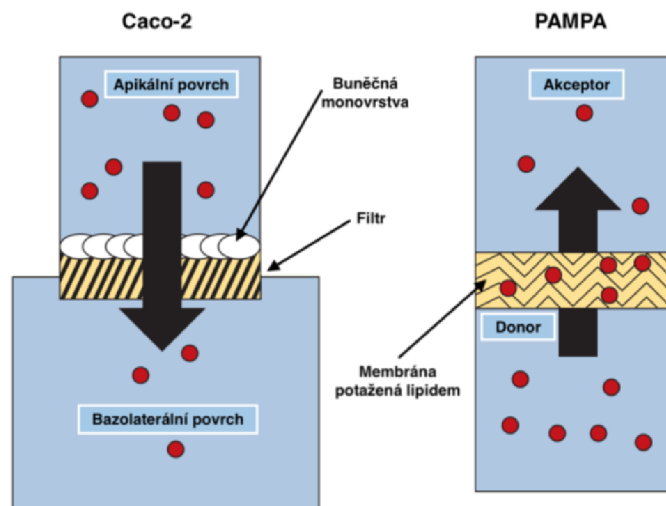


Obrázek 8: Schématické znázornění uspořádání akceptorové a donorové části desky.

Vysoce permeabilní metoda PAMPA se uplatňuje zejména pro primární screening velkého počtu sloučenin a poskytuje nám informace o vztahu mezi strukturou a výslednou permeabilitou látek přes selektivně propustné lipidové membrány napodobující střevní epitel. Bylo prokázáno, že rychlost permeace přes membránovou bariéru značně souvisí s rozsahem absorpce léčiva u lidí, proto se tento *in vitro* model pasivní difúze hojně využívá při studiu transportu látek gastrointestinálním traktem a taktéž k predikci penetrace sloučenin přes hematoencefalickou bariéru [Balimane a kol., 2006].

PAMPA esej je mnohem méně náročná na provedení než metody buněčných kultur. Velkou výhodou je, že experimenty s jejím využitím spotřebují pouze malé množství vzorku a nevyžadují žádné biologické tkáně, čímž se eliminuje mnoho zdrojů variability měření. Také možnost přizpůsobit lipidové složení konkrétním potřebám testu je jednou z velkých předností této metody, stejně tak jako její časová a finanční úspora [Dressman a kol., 2008].

Jedním z hlavních omezení tohoto modelu je však absence transportérů v umělé membráně. PAMPA tak hodnotí pouze transcelulární pasivní transport, tedy látky na základě jejich propustných vlastností, a absolutně nezvažuje absorpci sloučenin prostřednictvím transportérů či pórů. U sloučenin, jež jsou transportovány prostřednictvím více než jednoho mechanismu, poskytují výsledky podhodnocené informace o jejich celkové propustnosti [Dressman a kol., 2008]. S využitím Caco-2 buněčného modelu se pak provádí podrobnější mechanické studie, které definují různé cesty absorpce a hodnotí potenciál interakce látky s P-gp transportérem. Modely se proto v rané fázi vývoje léčiv využívají často v kombinaci [Balimane a kol., 2006].



Obrázek 9: Porovnání testů permeability s využitím modelu Caco-2 buněčné linie (vlevo) a *in vitro* modelu PAMPA (vpravo). Buněčná linie Caco-2 se sestává z různě velkých kompartmentů od sebe oddělených buněčnou monovrstvou. Model PAMPA je založený na schopnosti průchodu látky skrze polopropustnou umělou membránu mezi dvěma stejně velkými částmi porézní desky [upraveno dle Ruell, 2003].

Výsledky experimentů dále závisí i na zvoleném lipidů k přípravě membrány a stejně tak na pH použitého pufru. Volba pufru je omezena na základní fyziologické faktory procesu. Trávicí trakt je charakteristický pH gradientem, jež se se vzdáleností od žaludku zvyšuje. Pro získání výsledku shodného s účinkem *in vivo* je vhodné měření mezi pH 5 a 7,4 [Ruell, 2003].

3.3.2 Buněčné linie

V průběhu posledních několika let jsou buněčné linie široce využívány jako *in vitro* modely v rámci vývoje nových léčiv. Diplomová práce se zaměřuje výhradně na Caco-2 a MDCK buněčné linie. Vybrané experimentální buněčné modely se používají zejména pro transportní studie, jelikož dobře korelují s transportem léčiva přes sliznici člověka a jsou tak užitečné pro predikci absorpce studované látky. Jejich prostřednictvím se pak hodnotí především potenciální permeabilita mnoha sloučenin přes biologické bariéry a také farmakokinetické lékové interakce. Přítomnost aktivního transportního systému ve svých membránách z nich proto činí relevantní modely pro studium interakcí mezi studovanými látkami a transportéry.

In vitro testy permeability přes epitelální bariéru s využitím buněčných linií se obecně sestávají ze tří po sobě jdoucích fází, a to z fáze buněčné kultury, transportního experimentu a analýzy dat. První fáze spočívá zejména v pěstování adherentních buněk v kultivačních nádobách a kultivaci buněčné monovrstvy na polopropustných membránách. Druhá fáze představuje samotný experiment skutečného transport léčiva přes vytvořené monovrstvy a konečně, fáze analýzy zahrnuje měření koncentrace látky

ve vzorcích po provedení testu a výpočet relativní permeability látek skrze membránu (Papp) [Volpe, 2007].

Obě studované buněčné linie se skládají z heterogenních buněčných subpopulací [Volpe, 2011]. Výsledky transportních studií se tedy mohou měnit především v závislosti na rozdílných podmínkách kultivace buněčných kultur a prováděného experimentu, což vede k odlišným hodnotám Papp pro jednu a tu stejnou testovanou látku. Proto je k udržení nezměněné buněčné linie nutné pravidelné hodnocení morfologie buněk a základních funkčních charakteristik vytvořené monovrstvy [Delie a Rubas, 1997]. Během experimentu se charakteristika transportu kultivovaných buněk může lišit v souvislosti se stářím monovrstvy, hustotou očkování buněk, konfluencí buněk, režimem krmení, kultivačním médiem, pH transportního pufru, stupněm diferenciaci a dalšími parametry. Při práci s buněčnými liniemi je tedy potřeba dodržovat obecné doporučení související s optimálními podmínkami kultivace [Audus a kol., 1990].

3.3.2.1 Caco-2 buněčná linie jako model gastrointestinálního traktu

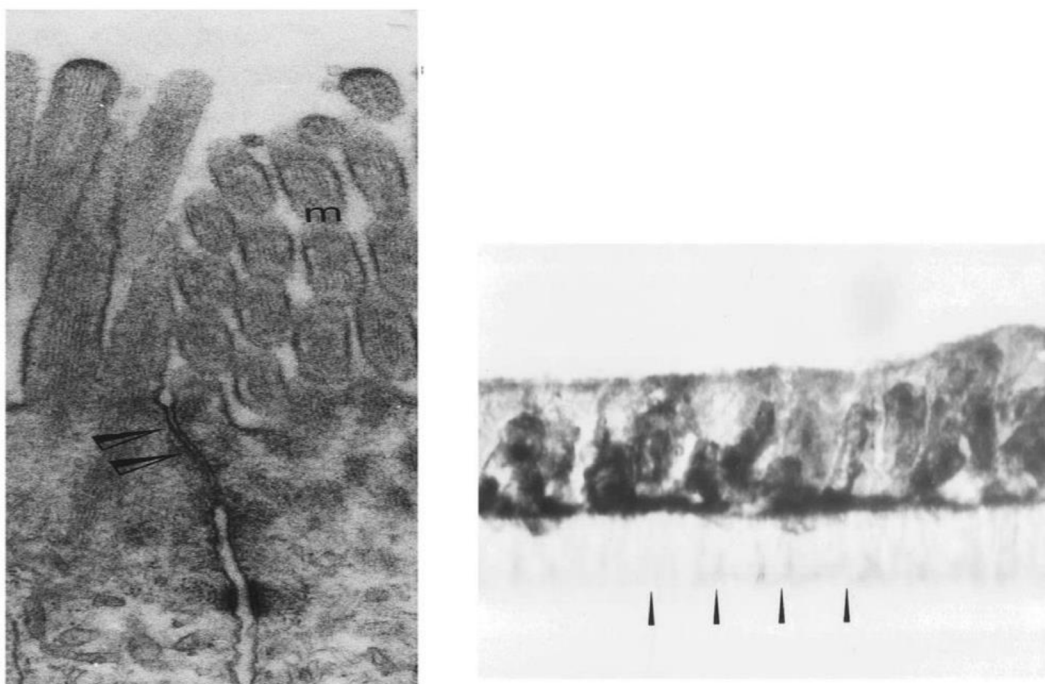
Caco-2 buněčná linie je ve výzkumu využívána jako *in vitro* model pro studium mechanismu epiteliálního transportu, a to zejména pro predikci absorpce léčiv a jiných sloučenin v gastrointestinálním traktu [van Breemen a Li, 2005]. V důsledku upřednostnění perorálního podání léčiv u člověka, je transport látek přes bariéru intestinálních epiteliálních buněk hlavním determinantem biologické dostupnosti *in vivo*. Propustnost studovaných látek v testech přes Caco-2 buňky více či méně koreluje s *in vivo* absorpcí u člověka, a tak se tento buněčný model predikce absorpce stal nedílnou součástí vývoje nových léčiv ve farmaceutických vývojových laboratořích [Fossati a kol., 2018].

Buněčná linie Caco-2 byla vyvinuta během výzkumu provedeném Dr. J. Foghem a jeho spolupracovníky v Sloan-Kettering institutu pro výzkum rakoviny. Jedná se o epiteliální buňky, rakovinového původu, které jsou odvozené z lidského adenokarcinomu tlustého střeva [Fossati a kol., 2018]. Tato linie buněk, charakteristická svou silnou přilnavostí k plastu, se rutinně pěstuje v médiu v kultivačních nádobách na semiporózních filtračních membránách. Za běžných kultivačních podmínek, tedy v přítomnosti séra a glukózy, se Caco-2 buňky vyznačují jedinečnou schopností spontánní diferenciaci. Diferenční proces vede k formaci polarizované buněčné monovrstvy. Vzniklá monovrstva pak vykazuje některé typické morfologické a funkční vlastnosti epiteliálních buněk tenkého střeva [Volpe, 2007]. Stejně jako u lidských enterocytů je plazmatická membrána organizována do dvou odlišných domén, apikální a bazolaterální, jež se liší svou strukturou a transportními vlastnostmi [Dressman a kol., 2008].

Během kultivace Caco-2 vytvářejí těsné spoje mezi buňkami, vyvíjejí kartáčový lem s rozlišenými pravidelnými mikrokly a exprimují řadu enzymů podílejících se na metabolické transformaci léčiv, včetně enzymů cytochromu P450 [Fossati a kol., 2018]. Mimoto buňky obsahují i řadu transportních proteinů nacházejících se v absorpčních střevních buňkách. Jedním z nich je například P-gp, a další proteiny spojené s mnohočetnou lékovou rezistencí [Karlsson a spol., 1993].

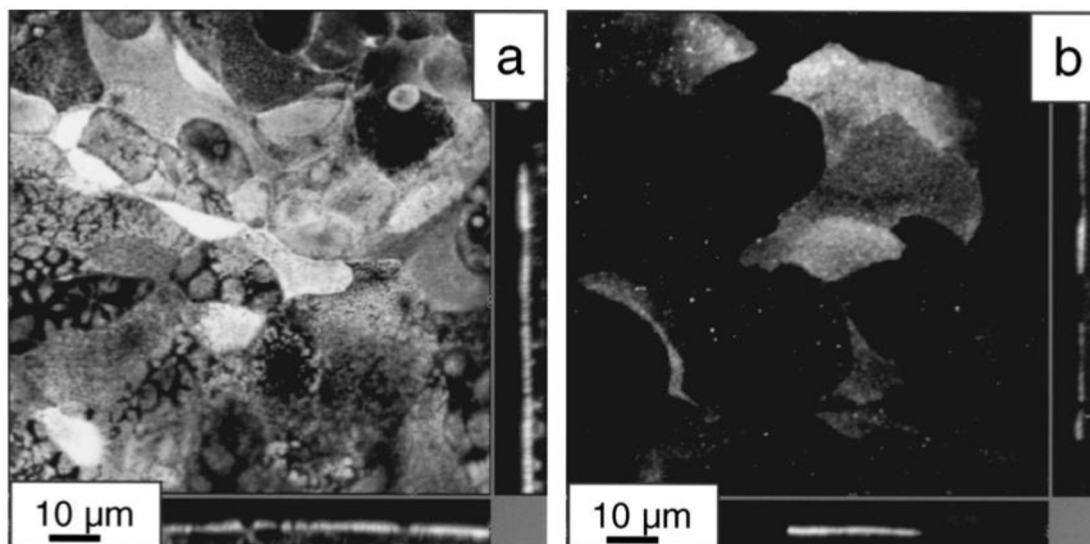
Caco-2 buňky vytvářejí různorodé linie skládající se ze subpopulací s různým stupněm diference ovlivněným kultivačními podmínkami a dobou v kultuře [Volpe, 2007].

Těsné spoje, tzv. „tight junction“, představují úzce spojené oblasti membrány vždy mezi dvěma sousedními buňkami, jež vytvářejí selektivně permeabilní bariéru mezi nimi. Tyto spoje vznikají v místech, kde kartáčový lem apikální membrány přechází v bazolaterální membránu. Jsou tedy faktorem stanovujícím rychlost transportu v mezibuněčném prostoru (paracelulární transport). Výsledky studií poukázaly na skutečnost, že se jedná o vysoce dynamické struktury, které v odezvě na mimobuněčné podněty mají schopnost měnit svou propustnost [Clayburgh a kol., 2004].



Obrázek 10: Vlevo – Transmisní elektronová mikrofotografie apikální části dvou buněk Caco-2 (na obrázku je pomocí šipek znázorněna přítomnost těsných spojů mezi buňkami a písmenem m vyznačené mikroklky). Vpravo – Mikrofotografie kryosekce monovrstvy intestinálních epiteliálních buněk [Artursson a kol., 2001].

Transportní studie se obvykle provádějí po 21 dnech kultivace, kdy exprese transportérů dosahuje svého maxima [Braun a kol., 2000]. Obecně je s využitím Caco-2 buněčných monovrstev cílem zjistit, zda je léčivo aktivně či pasivně transportováno přes intestinální epitel, a pokud je transport aktivní, úkolem je identifikovat typ příslušného transportéru [Burton s kol., 1993]. Aplikací sloučeniny nejprve například na apikální stranu v jedné sérii experimentů a na bazální stranu v další sérii je možné měřit rychlost transport látek přes monovrstvu buněk v obou směrech. Rozdíl v rychlostech, tzv. efluxní poměr, pak vypovídá o distribuci transportérů pro aktivní transport v buňkách [Dressman a kol., 2008].



Obrázek 11: Lokalizace P-gp transportérů v Caco-2 buňkách. Obě mikrofotografie zachycené po 27 dnech kultivace pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu (CLSM) představují optické řezy apikálních oblastí buněčné monovrstvy. Fluorescenční značení F-aktinu rhodamin-faliodinem odhaluje určitou heterogenitu struktury apikálního povrchu buněčných vrstev (obr. a). Značení buněk prostřednictvím specifické protilátky anti-P-gp pak poukazuje na lokalizaci P-gp transportérů, ne všechny buňky jsou však P-gp pozitivní (obr. b) [převzato od Braun a kol., 2000].

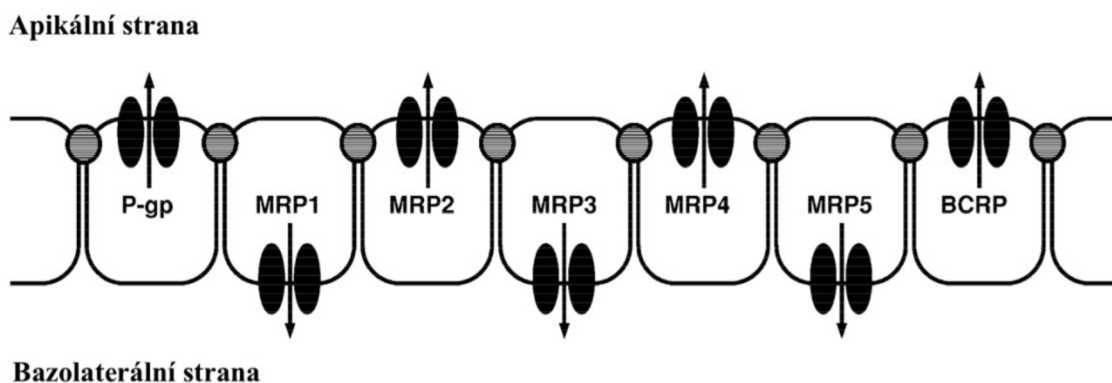
I přes velkou míru využití Caco-2 buněčné linie má tento model hned několik limitací, jako je například nedostatečná exprese enzymů cytochromu P450, a to zejména absence enzymu CYP3A4, jehož hladina je ve střevě vysoká, nebo také nepřítomnost hlenu [Balimane a kol., 2006]. Exprese vyšší hladiny těchto enzymů může být však indukována léčbou vitamínem D3. Ve srovnání s intestinálním epitelem se buněčná monovrstva skládá pouze a jen z buněk absorpčních, zatímco střevní tkáň lze klasifikovat do několika typů buněk, a tedy absorpčních enterocytů tvořících 80% všech epiteliálních buněk tenkého střeva, pohárkových buněk produkujících hlen, buněk enteroendokrinních exportujících hormony a M buněk specializovaných jako antigen prezentující buňky schopné fagocytózy, díky nimž jsou enterocyty součástí střevní imunologické bariéry a přímo se tak podílejí na imunitních procesech [Hilgendorf a kol., 2000].

Dalším omezením čistého buněčného systému Caco-2 je proměnlivá exprese některých transportních proteinů, tedy určitá existence nedostatečné korelace pro permeabilitu zprostředkovanou transportními proteiny ve srovnání s lidským střevem [Volpe, 2011]. Zatímco transportéry, jako PEPT či OAT, jsou v membránách Caco-2 buněčných linií přítomny v menším množství, transportní P-gp naopak vykazuje vyšší exprese v porovnání se situací *in vivo* [Dressman a kol., 2008], která může způsobit vyšší rychlost sekrece a následně nižší propustnost v absorpčním směru. Permeabilita sloučenin, jejichž transport je zprostředkován prostřednictvím nosiče, proto bývá v Caco-2 buňkách nižší než ve skutečnosti v lidském tenkém střevě. Tuto skutečnost pravděpodobně odráží kolorektální původ této buněčné linie [Hilgendorf a kol., 2000].

3.3.2.2 MDR1-MDCK buněčná linie jako model hematoencefalické bariéry

Použití buněčných kultur se zdá být z hlediska transportního mechanismu nejvhodnější k predikci potenciálu penetrace testovaných sloučenin přes hematoencefalickou bariéru (BBB, blood-brain barrier). Optimálními *in vitro* modely pro studium BBB jsou endoteliální buňky izolované z mozkových kapilár skotu, prasat či potkanů, avšak práce s nimi je velice nákladná a na provedení náročná. Z toho důvodu se většina prováděných studií zaměřila na epitelální buněčné linie (např. MDR1-MDCK, Caco-2) [Helinger a kol., 2012]. Cílem této literární rešerše je charakterizace MDR1-MDCK buněčné linie jako *in vitro* modelu pro predikci penetrace molekul přes BBB do mozku a identifikaci potenciálních substrátů efluxních transportérů, s největší pravděpodobností P-gp.

V padesátých letech minulého století pánové Madin a Darby odvodili buněčnou linii MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ze psích epitelálních buněk ledvin zdravé dospělé feny kokršpaněla. MDCK buňky však nejdříve byly použity ke studiu virové infekce [Dukes a kol., 2011]. Dnes patří mezi nejlépe prostudované epitelální buněčné linie, a i přes svůj původ, se velmi často používají ke studiu transportu mnoha látek [Braun a kol., 2000]. Umožňují mechanické hodnocení permeability léčiva, jako je pasivní difúze a aktivní transport zprostředkovaný přenašeči. Ve svých membránách totiž buňky MDCK exprimují jak efluxní tak i uptake transportéry (tab. 2) [Volpe, 2011].



Obrázek 12: Subcelulární lokalizace efluxních ABC transportérů v polarizovaných buňkách ledvin, jež odpovídají modelové buněčné linii MDCK. Transportéry P-gp, MRP2, MRP4 a BCRP jsou lokalizovány na membráně apikální a MRP1, MRP3 a MRP5 jsou naopak exprimovány na bazolaterální membráně ledvinných epitelálních buněk. Těsné spoje (šedě šrafované kruhy) tvoří fyzickou bariéru mezi apikální a bazolaterální plazmatickou membránou [převzato od Schinkel a Jonker, 2003].

Stejně jako Caco-2 buněčná linie během kultivace na polopropustných membránách tvoří i MDCK buňky polarizované monovrstvy s jasně definovanou apikální a bazolaterální polaritou buněčné membrány. Jednotlivé monovrstvy jsou pak spojeny sítí těsných spojů poblíž apikálního povrchu buněk. Stacionární fáze růstu buňky dosáhnou po 7 dnech naočkování [Braun a kol., 2000]. Jistou předností MDCK epitelální buněčné linie je především její rychlá doba růstu a skutečnost, že v porovnání s Caco-2 vykazuje nižší transepitelální elektrickou rezistenci (TEER), která je více méně podobná s *in vivo* hodnotami TEER tenkého střeva [Volpe, 2007]. Psí původ je však určitou

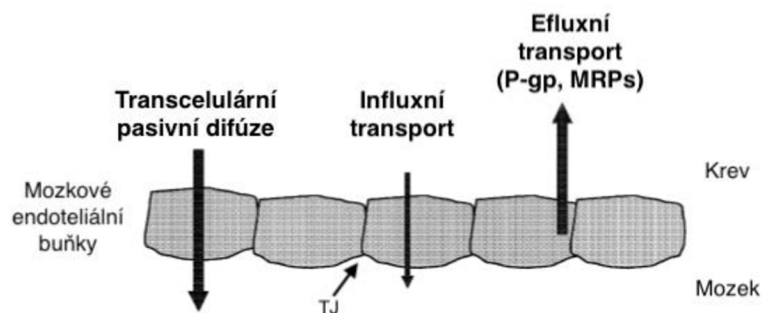
limitací tohoto buněčného modelu, protože komerčně dostupné protilátky jsou často vytvářeny proti lidským nebo myším sekvencím a nemusí tak dobře reagovat s psími proteiny [Dukes a kol., 2011].

Tabulka 2: Srovnání charakteristik Caco-2 a MDCK buněčných linií [vypracováno dle Volpe, 2007; Volpe, 2011].

	Caco-2	MDCK
Zdroj buněk	Lidský adenokarcinom tlustého střeva	Psí ledviny
Morfologie buněk	Intestinální epitel	Distální tubulární epitel
Doba kultivace	14 – 28 dní	3 – 7 dní
Enzymy	Laktáza, amino-peptidáza N, alkalická peptidáza, karboxylesteráza, glukuronyl-transferáza, sulfotransferáza, N-acetyltransferáza, glutathion S-transferáza a další.	Alkalická fosfatáza, sulfotransferáza, glutathion S-transferáza
Uptake transportéry	OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, PepT1, OCT1, OCT2 a OCT3	Oct2, peptidy a monokarboxylové kyseliny
Efluxní transportéry	P-gp (MDR1), MRP2, MRP4 a BCRP	Mdr1, Mrp1, Mrp2 a Mrp5

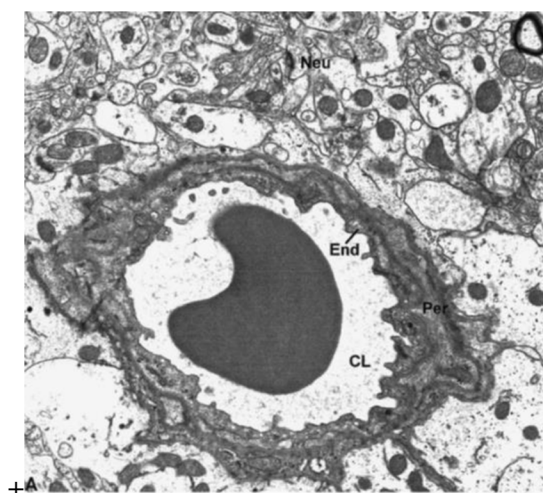
Epiteliální buněčná linie MDCK bývá, kvůli své poměrně nízké metabolické aktivitě, a především nízké expresi transportních proteinů, mnohdy transfekována jinými geny transportérů. Buněčná linie MDR1-MDCK představuje MDCK buňky typu II transfekované lidským genem MDR1 kódujícím efluxní P-glykoprotein. V důsledku transfekce pak buňky exprimují velké množství klinicky významného P-gp transportéru lokalizovaného na apikální straně polarizované monovrstvy [Braun a kol., 2000]. Pro pochopení vlivu transportních mechanismů na penetraci BBB je velmi důležitá charakterizace interakce studovaných sloučenin s P-gp, jakožto determinantem klasifikace [Feng a kol., 2019].

Monovrstvy MDR1-MDCK lze pak na základě koeficientů propustnosti (Papp) použít ke klasifikaci sloučenin na CNS-pozitivní nebo CNS-negativní [Wang a kol., 2005]. I přes původ epiteliálních buněk pocházejících z periferního orgánu a odlišnému lipidovému složení od mozkových kapilárních endotelových buněk, dosahuje model MDR1-MDCK vysoce srovnatelné korelace absorpce BBB *in vitro* – *in vivo* [Helinger a kol., 2012].



Obrázek 13: Schématické znázornění transportních mechanismů BBB [upraveno dle Di a kol., 2003].

Hematoencefalická bariéra představuje anatomickou strukturu kapilární sítě v mozku a vytváří primární rozhraní oddělující centrální nervový systém (CNS) a periferní oběhový systém. [Wang a kol., 2005]. BBB je tvořena endoteliálními buňkami mozkových kapilár, které prostřednictvím exprese transportérů přísně kontrolují molekulární pohyby mezi mozkiem a periferií a chrání tak mozkovou tkáň před invazí cizími látkami [Helinger a kol., 2012].



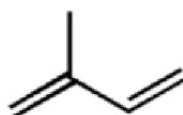
Obrázek 14: Hematoencefalická bariéra. Elektronová mikroskopie krevní kapiláry frontální kůry krysy. Kruhový průřez cévy je obklopen nervovou tkání (Neu) složenou z astrocytů a gliových buněk. Kapiláru samotnou tvoří endoteliální buňky (End), které jsou obklopené bazální membránou [převzato od Bendayan a kol., 2002].

3.4 Triterpeny

Látky testované v rámci diplomové práce se řadí mezi deriváty triterpenů. Jedná se o intenzivně studovanou skupinu látek vykazujících řadu biologických aktivit. Cílem je stanovit farmakokinetické vlastnosti nových derivátů a zaměřit se především na studium propustnosti látek.

Triterpeny patří mezi terpeny, strukturně rozmanité organické látky běžně obsažené v rostlinách či ovoci (například smetánka lékařská, hruška, jablko, mango, brusinka atd.), houbách, méně často jsou pak metabolizovány bakteriemi nebo syntetizovány i zvířaty, a to především v případě vyšších terpenů [Hajdúch a kol., 2004]. Terpeny představují nejrozšířenější skupinu pro rostlinu nepostradatelných

sekundárních metabolitů a jako takové se neúčastní hlavních metabolických drah. Namísto toho však rostliny poskytují různé obranné mechanismy proti napadení škůdci, stresu a chorobám [Zhou a kol., 2017]. Struktura terpenů je tvořena základními pětiuhlíkatými izoprenovými jednotkami a podle počtu jednotek izoprenu přítomných v molekule je pak lze rozdělit na mono-, seskvi-, di-, sester-, tri-, tetra- a polyterpeny. Uhlíkový skelet triterpenů se skládá ze šesti izoprenových jednotek, a tudíž celkově ve své struktuře obsahují 30 atomů uhlíku. Čistý izopren se však sám o sobě v přírodě téměř nevyskytuje [Ludwiczuk a kol., 2017].

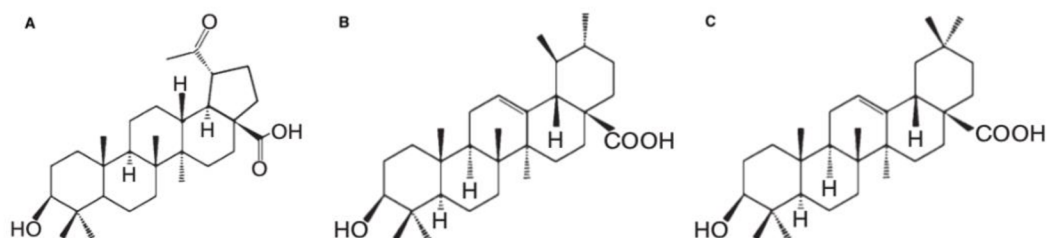


Obrázek 15: Chemická struktura izoprenu [převzato od Ludwiczuk a kol., 2017].

Triterpenoidní látky tvoří velmi početnou skupinu přírodních sloučenin s množstvím jedinečných a potenciálně využitelných biologických účinků. Jsou studovány zejména kvůli své značné cytotoxické aktivitě, a dále pak v souvislosti s jejich biologickou aktivitou (chemoprotektivními, virostatickými, antimikrobiálními, antimykotickými, hepatoprotektivními, protizánětlivými, analgetickými, anti-HIV a jinými účinky) [Hajdúch a kol., 2004]. Dosavadní výzkum ukazuje, že vlastní mechanismus účinku látek je velmi různorodý a jednotlivé skupiny působí na rozličné procesy v buňce. Příkladem můžou být látky měnící expresi proteinů, inhibující enzymy důležité pro replikaci virionu či patogenitu bakterie, látky indukující buněčnou smrt s přímým působím na mitochondrie a další [Džubák a kol., 2004]. Obecně platí, že triterpeny vykazují poměrně nízkou toxicitu, a to i při vyšších hodnotách koncentrace [Pokorný a kol., 2018].

3.4.1 Zástupci přírodních triterpenů

V posledních letech se dostala do popředí zájmu velká skupina cyklických triterpenů. Mezi biologicky nejvýznamnější a v přírodě nejvíce zastoupené patří především pentacyklické deriváty oleananu, ursanu a lupanu [Zhou a kol., 2017].



Obrázek 16: Chemická struktura vybraných cyklických triterpenů studovaných z hlediska jejich protinádorových vlastností: kyselina betulínová (A), kyselina ursolová (B), kyselina oleanolová [převzato od Petronelli a kol., 2009].

Kyselina ursolová (obr. 16) se vyskytuje především ve vyšších rostlinách. Inhibuje bovinní DNA polymerázu α a slabě i HIV reverzní transkriptázu a rostlinnou DNA polymerázu II. Vykazuje také inhibiční aktivitu vůči savčí DNA polymeráze α a β a lidských DNA topoizomeráz. V *in vitro* studiích je cytotoxická vůči řadě národových linií, jsou u ní popsány účinky antiangiogenní aktivity a inhibuje nádorový růst na modelech myši [Hajdúch a kol., 2004].

Kyselina oleanolová (obr. 16) je ve vysokých koncentracích rozšířená v kořenech ženšenu a dále také ve více než 120 rostlinných druzích. Podobně jako kyselina ursolová vykazuje množství protinádorových účinků a jsou u ní studovány jak antimutagenní vlastnosti, tak i antiangiogenní aktivita v nádorech [Hajdúch a kol., 2004].

Betulin a kyselina betulinová (obr. 16) patří mezi dva nejvýznamnější zástupce přírodních lupanových triterpenů. Kyselina betulinová je přírodní pentacyklický triterpen nacházející se v celé rostlinné říši. V čisté formě se jeví jako krystalický prášek bez chuti a zápachu a ve vodě téměř nerozpustný [Škarek a kol., 2011]. Příkladem volně dostupného zdroje je kůra břízy bělokoré, která sice obsahuje sloučeninu betulin, ten však lze poměrně snadno oxidací převést na kyselinu betulinovou [Patočka a Stiborová, 2004]. Kyselina betulinová vykazuje mimořádně vysokou aktivitu vůči lidskému melanomu [Škarek a kol., 2011] a byla jedním vůbec z prvních triterpenů s popsanou cytotoxickou aktivitou, která byla dodnes prokázána proti řadě testovaných nádorových buněčných linií [Hajdúch a kol., 2004]. Výhodou je, že u normálních zdravých buněk nevykazuje téměř žádné toxické účinky a jako potenciální účinné cytostatikum indukuje apoptózu u buněk rakovinných. Cytotoxická aktivita je spojena především s produkcí reaktivních forem kyslíku a smrt buňky je pak způsobena přímým účinkem na membránu mitochondrií, ze kterých se do cytosolu uvolní apoptogenní faktory (cytochrom C nebo ARF), kde aktivují kaspázy účastníci se procesu apoptózy [Raisova a kol., 2001]. Kyselina betulinová má však celou řadu dalších biologických vlastností. Spolu s některými jejími deriváty zvláště pak prokázaly anti-HIV aktivitu a představují novou skupinu léčiv proti HIV. Antivirový účinek spočívá především ve schopnosti navodit fúzi virových částic vazbou na virový glykoprotein gp41. Rovněž má protinádorové účinky a je studována jako potenciální antimalarikum [Patočka a Stiborová, 2004].

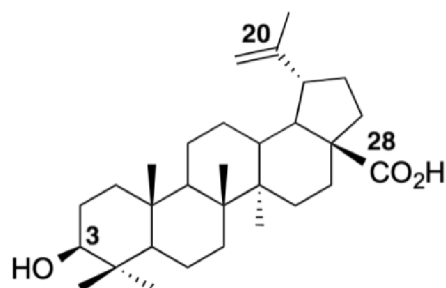
3.4.2 Deriváty triterpenů

I přes značné výhody je klinické užití přírodních triterpenů výrazně omezeno, a to zejména kvůli horším farmakokinetickým vlastnostem. Jedním z častých a obecných problémů triterpenů je jejich špatná rozpustnost ve vodě. Sloučeniny se tak špatně adsorbují z gastrointestinálního traktu, což omezuje jejich biologickou dostupnost. Vysoká lipofilita látek je považována za hlavní důvod, proč sloučeniny s vysokou aktivitou a selektivitou proti nádorovým buňkám často selhávají během pokročilého screeningu. Další omezením přírodních triterpenů je fakt, že v mnoha případech jsou účinné koncentrace mateřské sloučeniny příliš vysoké pro jejich následné terapeutické užití. Triterpeny také

představují typický příklad vícečlových sloučenin, což znamená, že často interagují s více proteiny v organismu a je obtížné najít in silico predikční modely pro hodnocení vztahu struktury a aktivity dané látky. Na druhou stranu jsou některé určité mechanismy triterpenů zcela ojedinělé a lze je teoreticky využít k vyléčení nemocí či překonání rezistence [Pokorný a kol., 2018].

S pokročilou analýzou přírodních triterpenů již několik desetiletí probíhá i vývoj jejich synteticky modifikovaných derivátů [Hajdúch a kol., 2004]. Snahou je především zvýšit terapeutický účinek triterpenoidů, syntetických derivátů terpenů, a snížit naopak účinky nežádoucí oproti jejich přírodním analogům [Džubák a kol., 2004]. Chemicky upravená verze farmakologicky účinné látky, která vyvolává požadovaný účinek v těle pomocí enzymatické a/nebo chemické transformace, se nazývá proléčivo. Strategie proléčiv prokázala svou efektivitu zejména při zlepšování fyzikálně-chemických a farmakokinetických vlastností sloučenin, čímž optimalizuje kteroukoli z vlastností ADMET pro potenciální kandidáty nového léčiva [Zhou a kol., 2017]. Existuje celá řada přístupů, jejichž společným zájmem je zvýšit aktivitu triterpenů [Pokorný a kol., 2018].

Kupříkladu polosyntetické deriváty kyseliny betulinové jsou chemicky syntetizovány s úmyslem zvýšit biologickou aktivitu při zachování nízké toxicity sloučenin. Deriváty modifikované v pozici C-3 kde se nachází hydroxylová skupina, C-20 alken nebo C-28 skupina karboxylová, a heterocyklické deriváty patří mezi nejběžnější vůbec [Kim a kol., 1998]. Polosyntetické triterpeny obsahující heterocykl v jejich molekule jsou navíc často selektivně cytotoxické vůči rakovinovým buňkám, což z nich činí slibné kandidáty na léčbu různých novotvarů [Borková a kol., 2020]. Klinické studie s kyselinou betulinovou doposud nebyly dokončeny. V současné době probíhá II. fáze klinického testování hodnotící její lokální aplikaci při léčbě dysplastického névu [Škarek a kol., 2011]. Kyselina betulinová tedy představuje vhodné agens k potenciálnímu terapeutickému využití a ve farmaceutickém průmyslu je cenným zdrojem vývoje nových farmakologicky účinných sloučenin [Patočka a Stiborová, 2004].

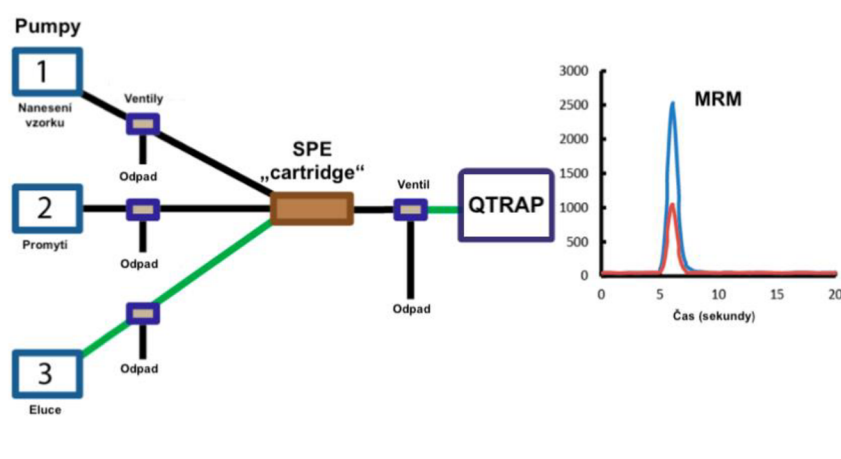


Obrázek 17: Vzorec kyseliny betulinové (kyselina 3β-hydroxy-lup-20 (29)-en-28-ová) a vyznačené C-3, C-20 a C-28 polohy vhodné pro modifikace [převzato od Pokorný a kol., 2018]

3.5 Analýza vzorků s využitím RF – MS/MS systému

Relativní koncentrace testovaných triterpenů byla po provedení ADME experimentů stanovena systémem RapidFire RF300 (Agilent Technologies, RF), který je spojený s hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex, MS) obsahujícím kvadrupólový analyzátor. Základní podstatou RF – MS/MS systému je online extrakce analyzované látky na pevné fázi a její následná detekce hmotnostní tandemovou spektrometrií [Veach a kol., 2017]. Jeho předností je především několikanásobné urychlení analýzy a zjednodušení postupu oproti konvenčním metodám („high – throughput screening“)

RapidFire představuje automatizované extrakční zařízení, které podle publikovaných prací [Danso a kol., 2015; Grote-Koska a kol., 2015; Korman a kol., 2015] nachází uplatnění především v toxikologii a ve farmakologii při monitorování potenciálních kandidátů léčiv. S jeho využitím lze z biologických vzorků stanovit širokou škálu analytů, zejména pak exogenních látek přítomných ve vzorcích v poměrně vysokých koncentracích. Česká republika v současné době vlastní prozatím jeden takový přístroj, který se nachází na oddělení Farmakologie v Ústavu molekulární a translační medicíny v Olomouci.



Obrázek 18: Schematicky znázorněný princip RF – MS/MS systému – celková doba jednoho cyklu se obvykle pohybuje okolo 15 sekund. Analýza všech vzorků na zcela zaplněné 96-jamkové destičce pak netrvá déle jako 30 minut [upraveno dle Veach a kol., 2017].

Samotné analýze sloučenin RF – MS/MS systémem předchází rozpuštění lyofilizovaných vzorků ve vhodné mobilní fázi obsahující vnitřní standard [Borková a kol., 2020]. Interní standard představuje vhodně zvolenou sloučeninu přidávanou v předem známém množství ke vzorku, jejíž signál se srovnává se signálem stanovovaného analytu. Následně se provede normalizace prostřednictvím poměru signálu analytu a jeho interního standardu, na němž je založena analytická odezva studované sloučeniny. Jako standardy jsou využívány buďto izotopicky značené formy látek, které mají být kvantifikovány, nebo pak pouhá strukturální analoga analytů, tedy látky s velmi podobnou strukturou však lišící se například absencí či přítomností funkční skupiny [Volný, 2020].

Princip jednoho extrakčního cyklu RapidFire (obr. 18) pak spočívá v aspiraci rozpuštěného vzorku přímo z 96-jamkové destičky do smyčky pro vzorek. Po naplnění smyčky dojde k vymytí vzorku v proudu mobilní fáze na stacionární fázi SPE patrony (v našem případě kolonka s náplní C4). Po extrakci je na patroně zadrženy analyt eluován s použitím druhé mobilní fáze do spektrometru, kde je následně detekován. Nežádané a na kolonce nezachycené látky jsou vymývány do odpadu. Celý cyklus uzavírá poslední fáze reekvilibrace, v níž se ještě před nasátím druhého vzorku vrátí systém do výchozího nastavení.

Z důvodu, že systém RapidFire pracuje v online režimu, je třeba brát v potaz i potenciálně vysoké riziko vzniku přenosového „carry over“ efektu. Ten nastává v případě, kdy analyt není dostatečně eluován z kolonky a jeho část je vyplavena až při vymytí vzorku dalšího. Následkem toho však dochází k falešnému zesílení intenzity analyzovaného vzorku. Zvolením silnější eluční mobilní fáze či prodloužením času vymývání vzorků lze pak přenosovému efektu předejít [Vrobel a kol., 2018].

V rámci našeho testování triterpenických látek se hmotnostně spektrometrická detekce provádí v módu pozitivních iontů za ionizace elektrosprejem. Hmotnostní spektrometr je optimalizován na stanovované látky a probíhá v režimu monitorování vybraných reakcí (MRM – multiple reaction monitoring) pro zajištění dostatečné selektivity metody. Nahrazení chromatografické separace v rutinně využívaných LC – MS/MS metodách onou extrakcí na pevné fázi sebou totiž nese riziko interference látek se stejnou hodnotou m/z [Jian a kol., 2011]. Takovými látkami mohou být například polohové izomery nebo izobarické látky, jejichž interferenci pozorujeme jako signál ve vzorku, ve kterém však kromě testované látky není přítomný žádný jiný analyt. S problematikou interference pak souvisí i vhodné nastavení iontového zdroje spektrometru. Značný význam má pak vhodné zvolení deklastračního potenciálu u metod stanovujících míru léčiva především v biologických vzorcích [Yan a kol., 2003]. Nastavení vysokého deklastračního potenciálu přispívá k fragmentaci méně stabilních látek v iontovém zdroji, což vede ke vzniku parentní molekuly. Při eventuálně nadměrnému výskytu těchto labilních konjugátů může potom docházet k chybnému zvýšení sledované intenzity dané látky. Příliš nízká hodnota pak může vést ke snížení citlivosti metody.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

- Buněčná linie Caco-2 (ATCC®, HTB-37™, USA)
- Buněčná linie MDCK-MDR1 získaná darem od Dr. K. Verhoef z pracoviště Netherlands Cancer Institute – Antoni van Leeuwenhoek, kde byl transfektant připraven
- Lidská plazma (transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Olomouc, Česká republika)
- Lidské jaterní mikrosomy (HMMCPL, Thermo Fisher Scientific, USA)

4.1.2 Použité chemikálie

- Acetonitril LC-MS čistoty (VWR; kat. č. BDH83640.100E)
- Antibiotikum Penicilin-Streptomycin – 10 000 jednotek penicilinu, 10 mg streptomycinu/ml (Sigma-Aldrich; kat. č. P4333)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, kat. č. 12300-31000)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Penta; kat. č. 12330-31000)
- Dimethylsulfoxid (EMSURE; kat. č. 1029521000)
- DMEM – Dulbecco's modified eagle's medium – high glucose – 4 500 mg/L glukózy, L-glutamin a bikarbonát sodný, bez pyruvátu sodného (Sigma-Aldrich; kat. č. D5796)
- Dodekan (Sigma-Aldrich; kat. č. 8205430100)
- Etanol (Penta, kat. č. 71250-11001)
- Fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma-Aldrich; kat. č. S0615)
- HBSS (1x) – Hanks' Balanced Salt Solution – vápník, hořčík, bez fenolové červeni (ThermoFisher Scientific™; kat. č. 14025-050)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekaghydrát (Penta; kat. č. 15140-31000)
- Hydroxid draselný (Penta, kat. č. 15520-31000)
- Chlorid draselný (Penta; kat. č. 16200-31000)
- Chlorid sodný (Penta; kat. č. 16610-31000)
- Isocitrát dehydrogenáza (Sigma-Aldrich; kat. č. I2002)
- Isocitrát (Sigma-Aldrich; kat. č. I1252)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, kat. č. 19360-11000)
- Kyselina mravenčí (Fluka; kat. č. 94318)
- Lecitin (Sigma-Aldrich; kat. č. P3782)
- Luciferázová žluť (Sigma-Aldrich; kat. č. L0144)
- MEM roztok neesenciálních kyselin (100×), bez L-glutaminu (Sigma-Aldrich; kat. č. M7145)
- Metanol LC-MS čistoty (VWR; kat. č. 102775-450)

- Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (Sigma-Aldrich; kat. č. N0505)
- 2-Propranol pro HPLC (VWR; kat. č. BT211315)
- Pyruvát sodný, 100 mM roztok (Sigma-Aldrich; kat. č. S8636)
- Síran hořečnatý (Sigma-Aldrich; kat. č. SAFA203726)
- TrypLE™ Express Enzyme 1×, bez fenolové červeni (ThermoFisher Scientific™, kat. č. 12604013)
- Trisodná sůl kyseliny L isocitronové (Sigma-Aldrich; kat. č. 1252)
- Voda pro HPLC LC-MS čistoty (VWR, kat. č. BDH23595.400)

4.1.3 Použité roztoky

- 1x PBS pufr (pH 7,4): 8,01 g NaCl + 0,21 g KCl + 1,5 g NaH₂PO₄ · 2H₂O + 3,6 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, rozpustit za stálého míchání v 500 ml dH₂O, upravit pomocí HCl na požadované pH, doplnit vodou do 1 000 ml
- NADPH generující systém: 0,44 mg NADP rozpustit v 71 μl 1x PBS pufru, 1,135 mg isocitrátu rozpustit v 71 μl 1x PBS pufru a oba roztoky smíchat, ke vzniklému roztoku přidat 14,3 μl isocitrát dehydrogenázy a 56,25 μl MgSO₄
- 100 mM dihydrogenfosforečnan draselný (pH 7,4): rozpustit 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 500 ml vody, hydroxidem draselným upravit na požadované pH
- Mobilní fáze +
 - A: objem 1 000 ml: smíchat 950 ml H₂O, 50 ml ACN a 1 ml kyseliny mravenčí
 - B: objem 1 000 ml: smíchat 950 ml ACN, 50 ml H₂O a 1 ml kyseliny mravenčí
- Kultivační médium
 - 450 ml DMEM + 50 ml FBS + 5 ml antibiotického roztoku
 - Pro Caco-2 buňky jsme odlili 250 ml kultivačního média do nové kultivační láhve a navíc přidali 2,5 ml pyruvátu sodného a 2,5 ml roztoku neesenciálních aminokyselin

Studované triterpeny byly syntetizovány skupinou doc. RNDr. Milana Urbana, Ph.D., katedra organická chemie, UMTM, Olomouc.

4.1.4 Použité soupravy

- Bürkerova komůrka (Blaubrand®)
- Černá 96-jamková deska s průhledným dnem (Corning®; kat. č. CLS3922)
- Deska pro PAMPU esej (Merck Millipore, donor – kat. č. MATRNPS550 a akceptor – kat. č. MAIPN4550)
- HTS Transwell® 96-jamková deska pro transportní studie s Caco-2 buňkami, velikost pórů 0,4 μm, polykarbonátová membrána (Corning®; kat. č. CLS3391)

- HTS Transwell® 96-jamková deska pro transportní studie s MDCK-MDR1 buňkami, velikost pórů 1,0 µm, polykarbonátová membrána (Corning®; kat. č. CLS3392)
- Rapid Equilibrium Dialysis Device Inserts (Life Technologies, kat. č. 90006)

4.1.5 Použité přístroje a zařízení

- Analytické váhy GR202 2202G (Schoeller Instruments s.r.o.)
- Centrifuga 514R (Hanil), destičkový rotor S500 4B s držáky na destičky S500T-4B TM96S (ID 12 12) (Hanil)
- Centrifuga Rotina 420R (Hettich® Zeutrifugen), rotor 4794
- CO₂ inkubátor Heracell™ 150i (ThermoFisher Scientific™)
- Digestoř Biohazard Thermo (Thermo Scientific)
- Laminární flowbox Herasafe KS (ThermoFisher Scientific™)
- Lyofilizační systém – CoolSafe (ScanVac), vakuová pumpa (Vacuubrand) a centrifuga (Thermo Scientific)
- Magnetická míchačka s ohřevem MR Hei-Tec (Heidolph Instruments)
- Mikroskop Primo Vert (Zeiss)
- Multifunkční čtečka mikrodestiček INFINITE® 200 PRO (TECAN)
- pH metr pH 50 VioLab DHS s pH sondou 201T (VioLab)
- Předvážky PS 1500/X (Radwag)
- Třepací inkubátor TS-100C (BIOSAN)
- Třepačka PSU-10i (Grant-bio Instruments)
- Třepačka temperovaná ES-20 (BIOSAN)
- Vodní lázeň WTB (Mettler)
- Vortex Genius 3 (IKA)
- Vortex MS 3 BASIC (IKA)
- RapidFire 300 (Agilent) a hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB SCIEX)

4.2 Použité experimentální metody

4.2.1 MS/MS přechody studovaných látek a použitá RF metoda

Koncentrace parentní sloučeniny byla po provedení jednotlivého ADME testu stanovena pomocí systému RapidFire RF300 (Agilent Technologies) spojeným s hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex) (RF – MS/MS). Prvním krokem k přípravě metody bylo naladění studovaných molekul na hmotnostním spektrometru QTRAP 5500. Hmotnostní spektrometr byl optimalizován na jednotlivé stanovované triterpeny a pracoval v MRM módu. Hmotnostně spektrometrická detekce testovaných triterpenů probíhala v pozitivním módu za ionizace turbosprejem. U studovaných sloučenin byly identifikovány parametry jako nalezené přechody MS/MS, deklasterizační potenciál, kolizní

energie a potenciál na výstupu kolizní cely. Naměřené hodnoty těchto parametrů jsou ukázány na příkladu látky LEM00023578 (tab. 3). Pro studované deriváty byly použity následující nalezené MS/MS přechody: LEM00023578 (563.2/52.9) LEM00023576 (561.2/81.3), LEM00023566 (684.3/480.3).

Tabulka 3: Parametry nalezené při optimalizaci hmotnostně spektrometrické detekce látky LEM00023578.

Látka 23578	Q1 Mass (Da)	Q3 Mass (Da)	DP (Volts)	CE	CXP
	563,178	81,3	226	91	14
		52,9	226	127	10
		495,4	226	43	20

Druhým krokem bylo stanovení vhodných podmínek extrakce na pevné fázi na RapidFire, kdy jsme vycházeli již z běžně používaných metod pro triterpeny na oddělení Farmakologie. Před samotnou analýzou bylo k látkám přidáno 200 µl mobilní fáze A (95% voda, 5% ACN, 0,1% kyselina mravenčí) s interním standardem (IS). V našem případě byla použita extrakční kolonka s náplní C4 a extrakční cyklus měl následující průběh: nasátí vzorku – 600 ms (10 µl), nástřik vzorku na kolonku – 3000 ms (mobilní fáze A – 95% voda, 5% ACN, 0,1% kyselina mravenčí), eluce – 7000 ms (mobilní fáze B – 95% ACN, 5% voda, 0,1% kyselina mravenčí) a reekvilibrace – 1500 ms. Průtok na jednotlivých pumpách RapidFire extraktoru byl následující: pumpa 1 – 1,5 ml/min, pumpa 2 – 1,25 ml/min, pumpa 3 – 0,4 ml/min.

Výstupní data z RF – MS/MS byla vyhodnocena pomocí softwaru RapidFire Integrator, který přímo převádí výstup z hmotnostního spektrometru na datové soubory. Získaná zintegrovaná data pak byla převedena do programu Microsoft Office Excel a dále zpracována.

4.2.2 Chemická stabilita

Při studiu chemické stability byly testované látky inkubovány ve fosfátovém pufru, který v podstatě zastává pufrovaný fyziologický roztok. S využitím této metody byla stanovena degradace dané sloučeniny spontánními neenzymatickými procesy.

Zásobní roztoky studovaných derivátů triterpenů byly připraveny našimi kolegy z chemické knihovny UMTM, a to v koncentraci 10 mmol·l⁻¹ roztoku DMSO. Poté bylo do náležitě označené 12-jamkové desky napipetováno 1 349 µl 1x PBS pufru a 1 µl 10 mmol·l⁻¹ roztoku látky. Inkubace látek probíhala při 37 °C, 250 rpm v třepacím inkubátoru TS-100C (BIOSAN) po celou dobu experimentu. Stabilita látek v pufru byla následně sledována v časových intervalech odběru 0, 15, 30, 60 a 120 minut. V momentě, kdy byly látky přidány k pufru a resuspendovány, jednalo se o čas prvního odběru (0 minut) a do 96-jamkové desky byl tedy co nejrychleji odebrán triplikát 75 µl vzorku na jamku.

Reakce byla ihned zastavena přidáním 150 μl ledově vychlazeného metanolu ke každému vzorku. Analogicky bylo postupováno i u všech dalších odběrů. Mezi jednotlivými odběry byla deska se vzorky ponechána v chladu. Po posledním odběru, v čase 120 minut, byly vzorky lyofilizovány na SpeedVacu. Koncentrace látky ve vzorku byla po provedení experimentu analyzována prostřednictvím systému RF – MS/MS.

Ještě před samotnou analýzou bylo k látkám přidáno 200 μl mobilní fáze A s interním standardem. Podstata použití interního standardu v experimentu spočívá především ve sledování výkonu RF – MS/MS systému a korigování drobných změn v odezvě v průběhu celého měření analyzovaného vzorku. Odezva testované sloučeniny je totiž založena na základě poměru ploch píků (plocha píku testované sloučeniny/ plocha píku interního standardu). Relativní koncentrace ve vzorku v čase 0 minut byla ve vzorku stanovena jako 100% koncentrace testované látky a v průběhu času byl vzhledem k tomuto vzorku měřen pokles její koncentrace. Uvedeného principu se využívá při testování sloučenin i u dalších námi použitých metod.

4.2.3 Plazmatická stabilita

Inkubace látek v lidské 100% plazmě byla další námi použitou metodou pro charakterizaci ADME vlastností derivátů triterpenů. Případná plazmatická nestabilita testované sloučeniny by byla zapříčiněna především působením enzymů plazmy, zejména pak hydroláz a esteráz, a měla by podstatný vliv na rychlost eliminace a účinek léčiva vůbec.

Studované látky byly ze zásobního 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku naředěny v 1x PBS pufru na požadovaný 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztok. Následně bylo do 12-jamkové desky pipetováno 1 495 μl plazmy a 4,95 μl 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku látky a po celou dobu experimentu byly látky při 38 °C inkubovány v třepacím inkubátoru, 250 rpm. Stabilita látek v lidské plazmě byla studována v časových intervalech odběru 0, 15, 30, 60 a 120 minut. V momentě, kdy byly látky přidány k plazmě a resuspendovány, jednalo se o čas prvního odběru (0 minut) a do 96 - jamkové desky byl co nejrychleji odebrán triplikát 75 μl vzorku na jamku. Reakce byla zastavena přidáním 150 μl ACN:MeOH v poměru 2:1 ke každému vzorku v jamce. Destička byla přelepena parafilmem a uschována v lednici. Zcela identickým způsobem byly v daných časech provedeny i ostatní odběry. Po posledním odběru, v čase 120 minut, se deska se vzorky nechala přes noc vymrazit na – 80 °C. Druhý den byly vzorky při pokojové teplotě pozvolna rozmrazeny a na centrifuze 514R (Hamil) s destičkovým rotorem S500 4B (Hamil) stočeny při 4 °C, 4 000 rpm po dobu 9 minut. Poté bylo do druhé čisté 96-jamkové desky přepipetováno 120 μl supernatantu. Vzorky byly lyofilizovány, rozpuštěny v mobilní fázi A s interním standardem a pomocí systému RF – MS/MS byla měřena koncentrace parentní látky ve vzorku.

4.3.4 Vazba na plazmatické bílkoviny

Studium vazby testovaných derivátů na bílkoviny plazmy bylo provedeno s využitím RED testu (Rapid Equilibrium Dialysis, Life Technologies). Metoda se zakládá na principu rovnovážné dialýzy,

kdy pro oddělení vázané a nevázané frakce využívá polopropustnou membránu. RED test se skládá ze dvou komůrek, R (red) a W (white), od sebe navzájem oddělených dialyzační membránou. Stupeň vazby na plazmatické proteiny ovlivňuje způsob distribuce sloučeniny do tkání, a tedy i její terapeutický účinek. Za farmakologicky účinnou by v organismu byla zodpovědná pouze volná frakce sloučeniny, a nikoliv ta vázaná.

Lidská plazma byla při pokojové teplotě pozvolna rozmrazena. Poté byl smícháním 100% krevní plazmy s 1x PBS pufrem zhotoven její 50% roztok. Komůrková základna („Teflon base plate“) byla po dobu 10 minut perfundována 20% etanolem. Etanol byl odstraněn a základna dvakrát promyta ultračistou vodou. Po vysušení byly na základnu umístěny R a W komůrky. Požadované 10 mmol·l⁻¹ roztoky studovaných látek v plazmě byly připraveny smícháním 1 μl 10 μmol·l⁻¹ roztoku látky a 999 μl 50% plazmy. Do červené komůrky (R) bylo pipetováno 300 μl plazmy s látkou a do bílé komůrky (W) bylo aplikováno 500 μl 1x PBS pufru. Komůrky se vzorky byly přelepeny adhezní folií a za stálého třepání byly na temperované třepačce ES-20 (BIOSAN) inkubovány po dobu 4 hodiny při 37 °C a 250 rpm. Po inkubaci bylo z červené i bílé komůrky odebráno 200 μl roztoku a přeneseno do 48-jamkové desky. K roztoku testované látky v plazmě bylo přidáno stejné množství pufru a k roztoku pufru byla přidána plazma. Ke všem roztokům bylo přidáno 400 μl srážecího činidla ACN/MeOH v poměru 2:1. Takto připravená deska se vzorky byla přes noc zamrazena na – 80 °C. Na druhý den byly vzorky při pokojové teplotě rozmrazeny a na centrifuze stočeny při 4 °C a 3 800 rpm po dobu 10 minut. 200 μl supernatantu bylo přepipetováno do 96-jamkové desky a vzorky byly lyofilizovány. Analýza studovaných látek byla po skončení testu provedena pomocí systému RF – MS/MS.

Na základě rozdílných koncentrací v jednotlivých komůrkách bylo podle níže uvedeného vzorce vypočítáno, jaké množství látky tvořilo volnou frakci a kolik procent látky bylo navázáno na bílkoviny plazmy.

$$fu = 1 - \left(\frac{PC - PF}{PC} \right)$$

kde PC je koncentrace testované látky navázané na bílkoviny plazmy (v červené komůrce), PF je koncentrace testované látky difundované přes membránu do PBS pufru (v bílé komůrce) a fu je množství volné frakce. Pro výpočet nenavázané frakce testované látky byl použit vzorec převzatý ze stránek cyprotexu [URL 1].

4.3.5 Mikrosomální stabilita

S využitím lidských jaterních mikrosomů byla studována metabolická stabilita látek. V průběhu experimentu byly látky inkubovány v přítomnosti lidských mikrosomů, NADPH kofaktoru enzymů I. fáze metabolismu a pufru. Mikrosomy jsou subcelulární frakce endoplazmatického retikula jaterních

buněk obsahující oxidační enzymy cytochromu P450 a enzymy konjugačních reakcí. Tyto biotransformační enzymy se spolu podílejí na celkovém metabolismu léčiv. Metabolickou přeměnou sloučeniny tak dochází ke snížení její koncentrace v organismu a ke zvýšení rychlosti eliminace z těla ven.

Studované látky byly ze zásobního 10 mmol·l⁻¹ roztoku naředěny v KH₂PO₄ pufru na pracovní 50 μmol·l⁻¹ roztok látky. NADPH generující systém, obsahující isocitrát dehydrogenázu, isocitrát, nikotinamid adenin dinukleotid fosfát a síran hořečnatý, byl podle protokolu připraven z výše uvedených látek a v závislosti na počtu látek testovaných. Následně ve 12-jamkové desce byla pro každou jednu látku připravena směs složená z 913 μl dihydrogen fosforečnanu draselného, 28 μl lidských mikrosomů a 67,2 μl připraveného NADPH generujícího systému. Deska se směsí se ponechala po dobu 5 minut preinkubovat při teplotě 38 °C v termobloku. Poté bylo ke směsi do každé jamky přidáno 127 μl 50 μmol·l⁻¹ připraveného roztoku studované látky. V průběhu celého experimentu byly látky inkubovány při teplotě 38 °C v třepacím inkubátoru (250 rpm). Mikrosomální stabilita látek byla sledována v časových intervalech odběru 0, 15, 30 a 60 minut. V momentě přidání látky ke směsi se jedná o čas 0, proto byl co nejrychleji do 96-jamkové desky odebrán triplikát 75 μl vzorku na jamku. Reakce byla zastavena přidáním 100 μl ACN:MeOH v poměru 2:1 ke každému vzorku. Deska s odebranými vzorky byla přelepena adhezivní fólií a ponechána v chladu. Stejný postup byl aplikován i u všech následujících odběrů v průběhu experimentu. Po posledním odběru, v čase 60 minut, se deska se vzorky nechala na 10 minut v chladu. Poté byly vzorky centrifugovány při teplotě 4 °C a 3 000 rpm po dobu 6 minut. 120 μl supernatantu bylo přepipetováno do nové 96-jamkové desky. Vzorky byly lyofilizovány, rozpuštěny v mobilní fázi A s interním standardem a pomocí systému RF – MS/MS byla měřena koncentrace parentní sloučeniny ve vzorku.

Získaná data byla, kromě měření poklesu koncentrace výchozí látky v závislosti na čase, navíc použita i pro výpočet vnitřní clearance (CL_{int}). CL_{int} byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$CL_{int} = V \times \frac{0,693}{t_{1/2}}$$

kde V je objem inkubace (v jednotkách μl vztažených na hmotnost mikrosomálního proteinu v mg na reakci) a hodnoty poločasu rozpadu (t_{1/2}) byly vypočteny podle rovnice t_{1/2} = 0,693/k, kde k je sklon přímky závislosti přirozeného logaritmu procenta zbývající sloučeniny na čase. Vzorec pro výpočet vnitřní clearance byl převzat z internetového zdroje cyprotex [URL 1].

4.3.6 Model pasivní difúze PAMPA

Metoda PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) byla využita ke studiu relativní permeability testovaných látek přes uměle zhotovenou membránu. Metoda představuje *in vitro* model pasivní difúze, který dovoluje hodnotit studované látky výhradně podle jejich permeabilních

vlastností. Protokol je založený na principu penetrace látky z donorové (spodní) do akceptorové (vrchní) části desky skrze umělou membránu potaženou lipidovým roztokem. Získaná data lze využít pro predikci absorpce látek *in vivo*.

Na počátku experimentu byly nejprve připraveny dva pracovní roztoky, iniciální a equilibriální. Naředěním zásobního 10 mmol·l⁻¹ roztoku studované látky s 1x PBS pufrem byly do 12-jamkové desky připraveny 2 ml roztoku této látky o finální koncentraci 20 μmol·l⁻¹. Vzniklý roztok byl označen jako iniciální. Do jiné 12-jamkové desky bylo přeneseno 450 μl tohoto iniciálního roztoku a k němu bylo přidáno dalších 225 μl 1x PBS pufru. Roztok byl označen jako equilibriální. Poté bylo na každou jamku spodního, donorového, plata aplikováno 300 μl roztoku iniciálního. V ultrazvukové lázni byl připraven 10% roztok lecitinu v dodekanu. Následně v digestoři byla 5 μl připraveného 10% roztoku lecitinu na jamku aktivována membrána horního, akceptorového, plata. Membrána po aktivaci lecitinem zprůhledněla a nejpozději do 10 minut bylo nutno do jamek akceptorové desky přidat 150 μl 1x PBS pufru. Desky byly sestaveny umístěním plata akceptorového na donorové tak, aby spodní strana membrány byla ve styku s iniciálním roztokem testované látky na donorovém platu, a přikryty vrchním víkem. Takto zkompletované desky byly ve tmě na třepače PSU-10i (Grant-bio Instruments) inkubovány při laboratorní teplotě a 70 rpm po dobu 18 hodin. Po inkubaci bylo do 96-jamkové desky přeneseno 120 μl vzorku v následujícím pořadí: akceptorový, equilibriální, donorový a iniciální roztok. Vzorky byly lyofilizovány a rozpuštěny v mobilní fázi A s interním standardem. Prostřednictvím systému RF – MS/MS byla po provedení experimentu analyzována koncentrace látky ve všech kompartmentech.

Naměřená data byla použita pro výpočet relativní permeability (P_{app}) studovaných látek skrze umělou membránu. Relativní permeabilita (P_{app}) byla vypočtena podle následujícího vzorce:

$$P_{app} = C \times \ln \left(1 - \frac{[\text{koncentrace akceptorového roztoku}]}{[\text{koncentrace equilibriálního roztoku}]} \right)$$

kde $C = (V_A \times V_D) / [(V_D + V_A) \times A \times T]$, V_D a V_A jsou objemy donorového a akceptorového roztoku, A je plocha membrány v cm² a T je čas inkubace v sekundách. Equilibriální koncentrace roztoku je koncentrace testované sloučeniny v celkovém objemu donorového i akceptorového kompartmentu. Vzorec pro výpočet relativní permeability látek byl převzat z internetových stránek cyprotexu [URL 1].

4.3.7 Test s Caco-2 a MDCK-MDR1 buněčnými liniemi

S využitím Caco-2 a MDCK-MDR1 buněčných linií byl studován transport látek přes biologické membrány. V našich experimentech byla Caco-2 buněčná linie využita jako *in vitro* model pro predikci absorpce studovaných látek v gastrointestinálním traktu a MDCK-MDR1 buněčná linie jako *in vitro* model k posouzení penetrace sloučenin přes hematoencefalickou bariéru. Buňky totiž ve svých membránách exprimují specifické transportní proteiny ovlivňující ADME vlastnosti látek.

V rámci diplomové práce jsme testovali, zda byly naše studované látky potenciálními substráty efluxních transportérů. Samotný transportní experiment byl pak založen na výsevu buněk na permeabilní inzerty, ošetření vytvořené buněčné monovrstvy studovanými látkami a na hodnocení jejich transportu přes monovrstvu v obou směrech, což umožnilo stanovit efluxní poměr.

Kultivace buněk

Buněčné linie Caco-2 a MDCK-MDR1 byly pěstovány v 25 cm² kultivačních láhvích pro tkáňové kultury, a to v kultivačním médiu (DMEM) doplněném 10% fetálním bovinním sérem, pro zajištění významných organických látek, a s přidavkem 1 % antibiotického roztoku obsahujícího penicilin a streptomycin, pro zabránění kontaminace kultury. Kultivační médium pro Caco-2 buňky bylo ještě navíc obohaceno o neesenciální aminokyseliny a pyruvát sodný. Buňky byly kultivovány standardním způsobem v CO₂ inkubátoru při 37 °C a ve zvlhčené atmosféře 5% oxidu uhličitého.

Buňky byly pravidelně 1 – 2x do týdne pasážovány, a to zpravidla při dosažení cca 90 - 95% buněčné konfluence, tedy pokrytí povrchu kultivační nádoby souvislou vrstvou buněk. Tato míra byla odhadnuta okometricky pozorováním buněk pod mikroskopem Primo Vert (Zeiss). Nejprve bylo z kultivační láhve odstraněno staré médium do odpadní nádoby a buňky byly dvakrát promyty 5 ml 1x PBS. Poté byl na buňky aplikován 1ml roztoku TrypLE a rovnoměrně rozprostřen po celé kultivační ploše láhve. Buňky byly inkubovány po dobu 10 minut při 37 °C v CO₂ inkubátoru. Po inkubaci byla láhev jemně poklepána, aby se usnadnilo uvolnění buněk z povrchu. K buňkám byly přidány 4 ml kultivačního média a pomocí pipety byly buňky důkladně, ale opatrně resuspendovány. Následně bylo malé množství buněk (v případě Caco-2 1:20, v případě MDCK-MDR1 1:60) přeneseno do nové kultivační nádoby s 5 ml média čerstvého.

Samotné médium bylo buňkám měněno dvakrát týdně. Jelikož Caco-2 a MDCK-MDR1 buňky patří mezi adherentní kultury, médium bylo odstraněno odsátím a následně pak bylo k buňkám doplněno 5 ml média nového.

Nasazení buněk na inserty

Před zahájením transportního experimentu byly nejprve jak Caco-2 tak MDCK-MDR1 buňky vysety na polyesterové inserty se semipermeabilní membránou, které jsou spojené s 96-jamkovými destičkami Transwell® (Corning) sloužícími jako rezervoáry. Velikost pórů, která účinně zabraňuje transmigraci buněk z apikální na bazolaterální stranu činí 0,4 μm pro Caco-2 a 1 μm pro MDCK-MDR1 buňky. Plocha jednotlivých jamek insertu pak je 0,143 cm² pro oba typy buněk.

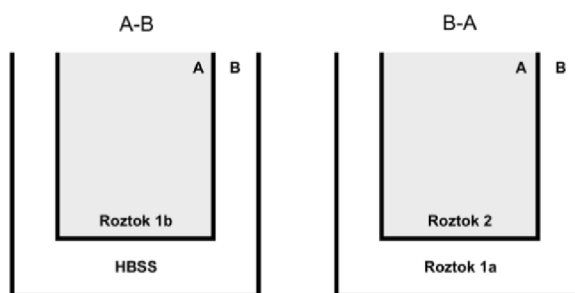
Před samotným výsevem buněk byly destičky aktivovány, a to přidáním 115 μl kultivačního média do každé jamky insertu a 250 μl do jamek rezervoáru. Po zkompletování pak byly desky po dobu 1 hodiny inkubovány při 37 °C v CO₂ inkubátoru.

Mezitím byly buňky pro výsev zpasážovány pomocí roztoku TrypLE a bylo k nim přidáno médium. Buněčná suspenze byla z kultivační láhve přenesena do centrifugační zkumavky typu Falcon a centrifuze Rotina 420R (Hettich®) centrifugována při 1 400 rpm po dobu 5 minut. Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl resuspendován v 5 ml nového média. S využitím Bürkerovy komůrky pro počítání buněk byl pod mikroskopem stanoven počet buněk v suspenzi. Suspenze pak byla dále zředěna tak, aby hustota buněk na nasazení činila 112 000 buněk/ml pro Caco-2 buňky a 30 000 buněk/ml pro MDCK-MDR1 buňky.

Po hodinové preinkubaci desek bylo z jamek insertu odsáto médium a do každé jamky byla nanášena buněčná suspenze v dané hustotě. Nasazené buňky pak byly inkubovány při 37 °C v CO₂ inkubátoru a po celou dobu kultivace jim bylo každý 2 – 3 den měněno médium. Caco-2 buňky byly pro vytvoření konfluentní monovrstvy funkčně a morfologicky polarizovaných buněk takto kultivovány po dobu 21 dnů. Oproti tomu buňky MDCK-MDR1 rostou rychle, a proto k vytvoření monovrstvy a diferenciaci buněk stačilo pouze 4-5 dnů inkubační doby a buňky byly připraveny na experiment.

Transportní studie

Pro transportní studie byly použity Caco-2 a MDCK-MDR1 diferencované monovrstvy pěstované v Transwell® 96-jamkových destičkách. Po dané inkubační době bylo z desek odstraněno médium. Buňky byly 3x promyty transportním médiem HBSS (Gibco). Poslední proplach byl na několik minut ponechán při 37 °C v inkubátoru. Byly připraveny roztoky pro bazolaterální desku (roztok 1a a HBSS) a apikální desku (roztok 1b a 2). Následující kroky jsou popsány pouze pro jednu studovanou látku, a proto jednotlivá množství byla v experimentech individuálně přizpůsobena počtu testovaných sloučenin a standardů.



Obrázek 19: Schéma distribuce jednotlivých roztoků v jamkách při transportní studii. A (apikální) reprezentuje insert se semipermeabilní membránou. B (bazolaterální) představuje akceptorovou jamku.

Ve 12-jamkové destičce byl roztok 1a připraven jako 10 μM roztok testované sloučeniny ve 2 ml HBSS. Ve druhé 12-jamkové destičce byl připraven roztok 1b tak, že bylo do ní přeneseno 750 μl roztoku 1a a byl zhotoven 100 μM roztok luciferázové žluti sloužící jako marker integrity

buněčné monovrstvy. Roztok 2 byl pak připraven smícháním 250 μl HBSS s luciferázovou žlutí na konečnou koncentraci 100 μM .

Po odstranění transportního média bylo do každé jamky obou desek napipetováno odpovídající množství připravených roztoků. Ošetřené buňky studovanou látkou byly inkubovány po dobu 1 hodiny pro MDCK-MDR1, respektive 2 hodin pro Caco-2 buňky. Po inkubaci bylo do nové 96-jamkové desky podle pipetovacího protokolu odebráno 85 μl vzorku z každé jamky apikální i bazolaterální části desky. Vzorky byly lyofilizovány. Následovně byly vzorky rozpuštěny v mobilní fázi A obsahující vnitřní standard a analyzovány pomocí systému RF – MS/MS. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech.

Zdánlivý koeficient propustnosti Papp (cm^2/s) byl vypočten podle následující rovnice:

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{C_0 A}$$

kde dQ/dt je rychlost permeability látky přes buňky ($\mu\text{mol}/\text{s}$), C_0 je koncentrace v bazolaterální části v čase nula (mmol/l) a A je plocha buněčné monovrstvy (cm^2). C_0 se získalo z analýzy bazolaterálního roztoku hned na začátku experimentu. Vzorec pro výpočet koeficientu propustnosti byl převzat z literatury Pokorný a kol., 2021.

Stanovení transportu studovaných látek přes buněčnou monovrstvu v obou směrech pak umožnilo určit efluxní poměr (ER), který byl definován podle následující rovnice:

$$ER = \frac{P_{\text{app}}(\text{BA})}{P_{\text{app}}(\text{AB})}$$

kde $P_{\text{app}}(\text{BA})$ a $P_{\text{app}}(\text{AB})$ představují koeficienty permeability testované sloučeniny od bazální k apikální (B-A) a od apikální k bazální (A-B) straně buněčné monovrstvy. Pro výpočet efluxního poměru byl použit vzorec z literatury Pokorný a kol., 2021. Sloučeniny s efluxním poměrem $ER > 2$ jsou považovány za potenciální substráty efluxních transportérů a naopak efluxní poměr $ER < 2$ poukazuje na zapojení uptake transportérů v transportu dané látky. Efluxní poměr ER kolem 1 naznačuje pasivní difúzi látky přes epitel.

Na konci každého experimentu byl pak podle následující rovnice proveden výpočet návratnosti sloučeniny, tzv. recovery hodnoty:

$$\text{Recovery} = \frac{\text{Celkové množství látky v akceptor. a donor. kompart. na konci experimentu (nmol)}}{\text{Množství látky v donor. kompart. na začátku experimentu (nmol)}} \cdot 100 [\%]$$

Vzorec pro výpočet recovery hodnoty byl použit z literatury Pokorný a kol., 2021. Stanovení recovery hodnoty nám bylo užitečné zejména při interpretaci dat o permeabilitě sloučenin. Pro zajištění přesnosti

a vysoké spolehlivosti získaných Papp hodnot, by se měla hodnota recovery pohybovat ve stanoveném limitním rozsahu (80-120 %). Pokud je však v experimentu recovery hodnota příliš nízká, může to znamenat špatnou rozpustnost látky, vazbu sloučeniny na hydrofobní povrch testovací desky nebo na membránu inzertu, dále také metabolickou degradaci buňkami, nebo akumulaci sloučeniny v buněčné monovrstvě.

Při studiu buněčné permeability byly kromě toho využity ještě referenční léčiva jako standardy již se stanovenými hodnotami Papp a efluxního poměru. V experimentech s Caco-2 buňkami byl jako nízký Papp standard použit rhodamin, zatímco verapamil byl použit jako referenční látka s vysokou buněčnou permeabilitou, která může být jak substrátem, tak inhibitorem P-gp transportéru. V MDCK-MDR1 buněčných testech pak byly jako standardy použity látky atenolol pro svou nízkou hodnotu Papp a propranolol vykazující naopak vysokou hodnotu Papp.

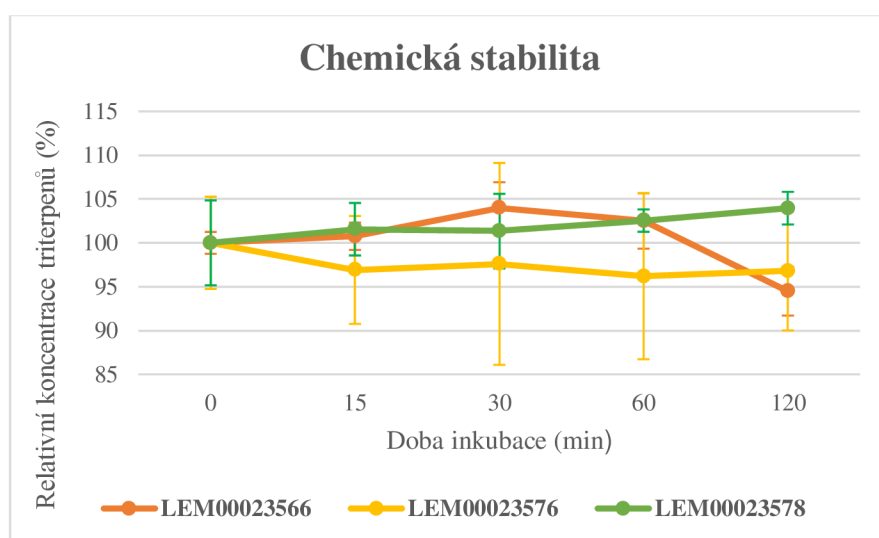
Měření integrity buněčné monovrstvy

Pro zajištění kvality provedeného experimentu byla ověřena integrita buněčné monovrstvy luciferázovým testem (Lucifer Yellow Rejection Assay). Luciferázová žluť je sloučenina, která vykazuje nízkou permeabilitu a je tak schopna procházet buněčnou monovrstvou pouze prostřednictvím pasivního paracelulárního transportu. Přidává se do jamek inzertní desky, a pokud je monovrstva buněk správně narostlá a vytváří těsné spoje, neměla by se luciferázová žluť na konci experimentu vůbec objevit v jamkách bazolaterální desky. Zbylé roztoky 1a a HBSS, po odebrání vzorků pro měření RF – MS/MS, z jamek bazolaterální desky byly přeneseny do černé 96-jamkové desky Corning s průhledným dnem (roztoky pro měření relativní fluorescence basolaterální – RFU_{bas}). Pro měření relativní fluorescence apikální (RFU_{api}) byly použity roztoky 1b a 2 obsahující luciferázu. Fluorescence byla měřena na fluorescenčním readeru TECAN (Micro plate reader Infinite 200 PRO). Vlnové délka excitace byla 485 nm a emise 530 nm. Bylo vypočítáno procento netransportované luciferázové žluti v apikální části desky: % RFU = 100 x (1 - RFU_{bas} / RFU_{api}).

5 VÝSLEDKY

5.1 Chemická stabilita

Chemická stabilita studovaných triterpenů byla testována inkubací látek ve fosfátovém pufru, který v zásadě představuje pufovaný fyziologický roztok. Stabilita látek v přítomnosti pufru byla sledována v průběhu celých dvou hodin, kdy byly odebrány triplikáty vzorku po 0, 15, 30, 60 a 120 minutách. Grafické znázornění závislosti chemické stability (%) látek na čase je uvedeno v obrázku č. 20.

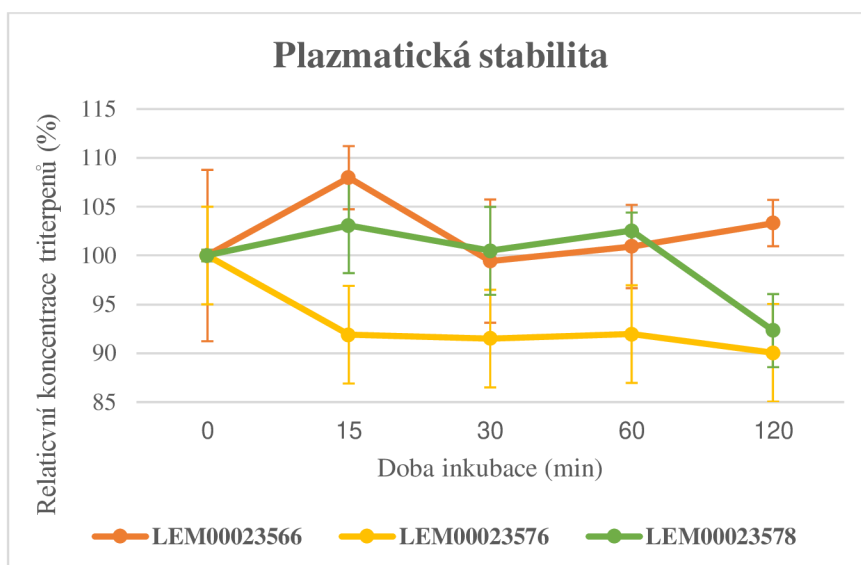


Obrázek 20: Graf závislosti relativní koncentrace (%) studovaných triterpenů na době inkubace (min) ve fosfátovém pufru.

V případě našich studovaných triterpenů byla stanovena velice dobrá chemická stabilita, kdy po dvou hodinách inkubace bylo u všech sloučenin přítomno více jako 90 % původní koncentrace látky v čase 0. Téměř zanedbatelný úbytek koncentrace látek by mohl být zapříčiněn neenzymatickými reakcemi.

5.2 Plazmatická stabilita a vazba na plazmatické proteiny

V případě testování plazmatické stability byly studované triterpeny v průběhu dvou hodin inkubovány ve 100% lidské plazmě. Vzorky byly odebrány v časových intervalech 0, 15, 30, 60 a 120 minut a byla sledována jejich případná nestabilita. Grafické znázornění závislosti plazmatické stability (%) látek na čase je shrnuto v obrázku č. 21.



Obrázek 21: Graf závislosti relativní koncentrace (%) studovaných triterpenů na době inkubace (min) ve 100% lidské plazmě.

Všechny studované látky vykazovaly v plazmě opět velmi dobrou stabilitu a bylo u nich po dvou hodinách inkubace stanoveno více jako 90 % původního množství látky v čase 0. Určitá nestabilita látek mohla být způsobena zejména účinky plazmatických enzymů.

Na příkladu plazmatické stability pro látku LEM00023566 a její interní standard, jímž byla vhodně zvolená látka LEM00023576, je ukázáno vyhodnocení dat (tab. 4). V rámci testování plazmatické (chemické i mikrosomální) stability látek byl v každém časovém intervalu odebrán triplikát vzorku. Následně byla s pomocí systému RapidFire stanovena plocha píku parentní sloučeniny a interního standardu. Výstupní data z RF – MS/MS byla vyhodnocena pomocí softwaru RapidFire Integrator a převedena do programu Microsoft Office Excel.

Tabulka 4: Kompletní data plazmatické stability pro látku LEM00023566.

Plazmatická stabilita pro látku LEM00023566								
Čas [min]	Látka 23566 (684.2/480.3)				IS 23576 (561.2/81.3)			Průměr
	Průměr				Průměr			
0	39625945	38433439	31197492	36418959	77252981	71883378	69281909	72806089
15	41570241	40823158	39427965	40607121	79855447	73530937	72797439	75394608
30	37375750	37576655	38922777	37958394	81186999	72705105	75995666	76629257
60	39452013	37143779	39975339	38857044	79584299	76161504	75668539	77138114
120	40416069	39131234	39676030	39741111	80310748	75725838	75187536	77074707

Studovaná látka/IS	Průměr	Finální [%]	SD [%]
0,513 0,535	0,450	0,499	100
0,521 0,555	0,542	0,539	108
0,460 0,517	0,512	0,496	99
0,496 0,488	0,528	0,504	101
0,503 0,517	0,528	0,516	103

Hodnoty relativní koncentrace jsou vypočítány na základě poměru ploch piků a to testované sloučeniny ku internímu standardu. Byl stanoven průměr těchto hodnot a směrodatné odchylky. Čas nula minut slouží ke stanovení 100% relativní koncentrace látky a v průběhu času byl tedy měřen pokles koncentrace testované látky. Ve výsledných grafech pak byla uvedena už pouze procentuální relativní koncentrace zbylé sloučeniny ve vzorku. Ve výsledcích je vždy kontrolováno, aby směrodatné odchylky pro jednotlivé časy nepřesahovaly více jak 10 %. Pokud však přesahují, přistupujeme k tomu tak, že vzorek znovu změříme. V případě, že odchylky stále přesahují stanovenou hranici, je zkontrolována samotná metoda RF-MS/MS, popřípadě je experiment znovu zopakován.

Dále byla s využitím RED testu hodnocena vazba studovaných triterpenů na bílkoviny plazmy. Podle vzorce (uvedeného v kapitole č. 4) bylo z naměřených koncentrací v komůrkách vypočítáno, kolik procent látky tvořilo volnou a kolik navázanou frakci na plazmatické proteiny (tab. 5).

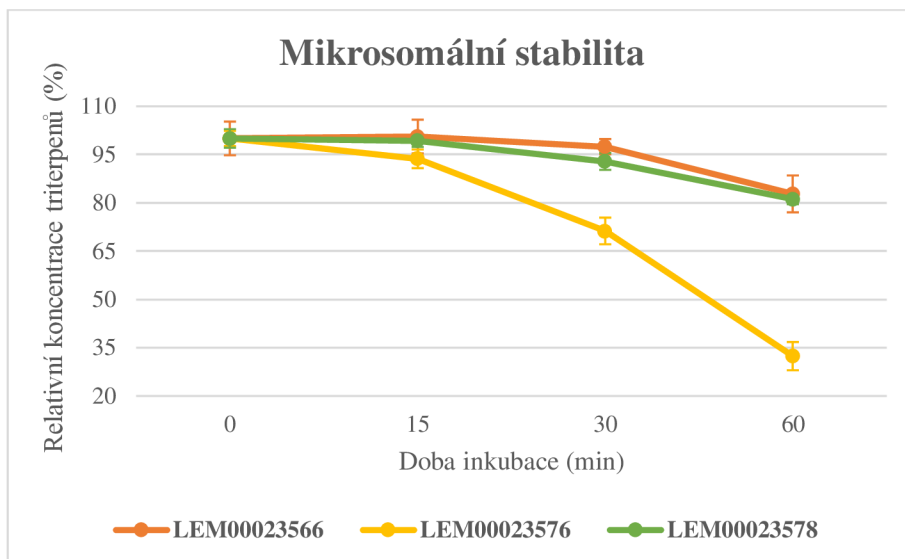
Tabulka 5: Procento vázané frakce studovaných triterpenů na bílkoviny plazmy.

Studované látky	Vazba na proteiny plazmy
	Rapid Equilibrium dialysis vázaná frakce (%)
LEM00023566	99,35 ± 0,10
LEM00023576	89,56 ± 0,16
LEM00023578	99,38 ± 0,19

U všech studovaných triterpenů byla stanovena vysoká vazba na plazmatické proteiny (pravděpodobně nejvíce na sérový albumin a α_1 -acid glykoprotein). Ukázalo se, že látky LEM00023566 a LEM00023578 vykazovaly až 99 % navázané frakce na bílkoviny. Za farmakologický účinek je však v organismu odpovědná pouze volná frakce sloučeniny, a nikoliv ta vázaná.

5.3 Mikrosomální stabilita

Mikrosomální stabilita studovaných triterpenů byla testována v přítomnosti lidských jaterních mikrosomů a NADPH generujícího systému. Stabilita látek byla sledována v průběhu jedné hodiny, kdy byly odebírány triplikáty vzorků po 0, 15, 30 a 60 minutách. Grafické znázornění závislosti mikrosomální stability (%) látek na čase je zobrazeno v obrázku č. 22.



Obrázek 22: Graf závislosti relativní koncentrace (%) studovaných triterpenů na době inkubace (min) v přítomnosti jaterních mikrosomů.

ADME testem mikrosomální stability bylo testováno, do jaké míry jsou studované látky metabolizovány prostřednictvím biotransformačních enzymů cytochromu P450. U všech tří studovaných triterpenů byl v závislosti na čase pozorován trend v poklesu koncentrace. Látka LEM00023576 vykazovala ze všech nejnižší stabilitu a po hodinové inkubaci byl u ní stanoven úbytek látky až na 32 % z počáteční koncentrace.

Naměřená data byla dále využita pro výpočet vnitřní clearance (CL_{int}) (vzorec uvedený v kapitole č. 4) a podle tabelovaných hodnot byla provedena klasifikace našich výsledků. Usuzujeme, že studované látky LEM00023566 a LEM00023578 nepodléhají rychlému metabolismu mikrosomálními enzymy a spadají tak do kategorie s nízkou hodnotou vnitřní clearance. Poměrně vysokou metabolickou hodnotu však v průběhu testování vykazovala látka LEM00023576, která byla dle klasifikace zařazena do kategorie látek se středně vysokou hodnotou vnitřní clearance.

5.4 Model pasivní difúze PAMPA

K hodnocení propustnosti studovaných triterpenů přes umělé polopropustné membrány byl využit *in vitro* model pasivní difúze PAMPA. Permeabilita byla po zkompletování desek pro PAMPU esej testována inkubací látek v donorové části desky. Po 18 hodinách inkubace látek ve tmě byla z naměřených koncentrací ve všech kompartmentech stanovena podle vzorce (kapitola č. 4) relativní permeabilita látek (tab. 6).

Tabulka 6: Relativní permeabilita a příslušné kategorie propustnosti studovaných triterpenů skrze uměle vyrobenou membránu.

Studované látky	PAMPA	
	log Papp	Kategorie
LEM00023566	-7,644 ± 0,075	Nízká
LEM00023576	-6,206 ± 0,126	Nízká
LEM00023578	-8,217 ± 0,050	Nízká

V průběhu inkubace vykazovaly všechny studované látky relativně nízkou schopnost pronikat skrze umělou membránu prostřednictvím pasivní difúze, a proto byly na základě vypočítaných hodnot log Papp zařazeny do kategorie látek s nízkou propustností. Kvůli absenci transportérů v umělé membráně jsme však s využitím této nebuněčné metody byli schopni zvažovat pouze podíl transcelulárního pasivního transportu látek.

5.5 Testy s Caco-2 a MDCK-MDR1 buněčnými liniemi

Ke studiu aktivního transportu látek přes biologické membrány byly použity buněčné linie, a to intestinální *in vitro* model Caco-2 a hematoencefalický *in vitro* model MDCK-MDR1. Buňky byly ošetřeny připravenými roztoky studovaných látek a inkubovány po dobu 1 hodiny pro MDCK-MDR1, respektive 2 hodin pro Caco-2 buňky. Na konci transportního experimentu byl po odebrání vzorků a měření RF-MS pro všechny látky vypočítán zdánlivý koeficient propustnosti Papp a efluxní poměr (tab. 7) podle rovnic uvedených v kapitole č. 4. Dále byl proveden výpočet návratnosti sloučeniny, tzv. recovery hodnota, a luciferázovým testem byla ověřena integrita buněčné monovrstvy.

Tabulka 7: Zdánlivý koeficient propustnosti, příslušná kategorie a efluxní poměr studovaných triterpenů testovaných v experimentech s Caco-2 a MDCK-MDR1 buňkami.

Studované látky	Caco-2	MDCK-MDR1
	Kategorie	CNS negativní / positivní
LEM00023566	Nízká Papp (x10e-6): 0,042 Efluxní poměr: 13,05 Aktivní eflux: Ano % recovery: 74,22	CNS negativní Papp (x10e-6): 0,337 Efluxní poměr: 3,88 Aktivní eflux: Ano % recovery: 102,35
LEM00023576	Nízká Papp (x10e-6): 0,664 Efluxní poměr: 2,07 Aktivní eflux: Ano % recovery: 54,47	CNS negativní Papp (x10e-6): 1,25 Eflux ratio: 2,53 Aktivní eflux: Ano % recovery: 52,88
LEM00023578	Nízká Papp (x10e-6): 0,0256 Efluxní poměr: 84,51 Aktivní eflux: Ano % recovery: 20,46	CNS negativní Papp (x10e-6): 0,0366 Efluxní poměr: 26,19 Aktivní eflux: Ano % recovery: 61,89

Studované triterpeny nebyly v našich experimentálních podmínkách dostatečně schopné procházet skrze vytvořenou Caco-2 buněčnou monovrstvu, a tak byly podle výsledných hodnot $Papp_{(AB)}$ zařazeny do kategorie látek s nízkou propustností. V testech s MDCK-MDR1 buňkami se ukázalo, že látky opět vykazovali nízkou permeabilitou a byly tak označeny jako CNS negativní. Jak nám indikují efluxní poměry $E > 2$, v obou buněčných modelech byly látky efluxními transportéry aktivně vypuzovány z buněk ven.

5.6 Statistické hodnocení dat

Všechna naše data byla statisticky vyhodnocena pomocí statistického programu Statistica. Statistická významnost byla vypočítána s použitím neparametrického testu Man-Whitney U test. Rozdíly s korigovanými hodnotami $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Chybové úsečky v grafech jsou směrodatné odchylky.

6 DISKUSE

V oblasti výzkumu se do popředí zájmu dostaly přírodní triterpeny, které jsou studovány především pro svou biologickou a značnou cytotoxickou aktivitu [Hajdúch a kol., 2004]. Avšak i přes prokázané terapeutické účinky je kvůli nedostačujícím farmakokinetickým vlastnostem jejich klinické užití značně omezeno [Pokorný a kol., 2018]. Právě znalost základních ADME vlastností nové chemické entity získaná prostřednictvím preklinických dat z *in vitro* modelových systémů je kritická v programu objevování léčiv [Chao a kol., 2010]. Cílem diplomové práce tak byla preklinická studie sady tří nově syntetizovaných derivátů triterpenů, jakožto možných potenciálních léčiv vykazujících eventuálně lepší stabilitu a biologickou dostupnost oproti jejich přírodním analogům.

V rámci testování byly využity *in vitro* metody charakterizující ADME vlastnosti studovaných látek, a právě studium propustnosti (pasivní i aktivní transport) bylo hlavním bodem praktické části diplomové práce. Ke studiu metabolismu byly využity metody stanovující stabilitu testovaných derivátů triterpenů ve fosfátovém pufru, lidské plazmě a taktéž v přítomnosti jaterních mikrosomů. Vazba těchto látek na bílkoviny plazmy byla testována pomocí RED testu založeném na rovnovážné dialýze. A konečně ke stanovení propustnosti látek přes membrány byly využity experimentální Caco-2 a MDCK-MDR1 buněčné linie a nebuněčná metoda PAMPA.

Studované deriváty triterpenů byly syntetizovány skupinou doc. RNDr. Milana Urbana, Ph.D., Katedra organická chemie, PřF, UPOL. Z důvodu, že látky nejsou ještě doposud patentovány ani opublikovány, v rámci práce nesmí být jejich chemická struktura vůbec zveřejněna. Triterpeny jsou tak uvedeny pouze pod svými přidělenými LEM kódy – LEM00023566, LEM00023576 a LEM00023578, přičemž se jedná o oficiální označení naší chemické knihovny UMTM.

Veškeré výsledky nově syntetizovaných derivátů triterpenů získané v praktické části práce z jednotlivých ADME experimentů byly shrnuty do tabulky č. 8.

Tabulka 8: Vyhodnocení ADME vlastností nově syntetizovaných derivátů triterpenů.

Studované látky	Metabolismus							Vazba na proteiny plazmy	Permeabilita			
	<i>in vitro</i>							<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vivo</i>	
	Chemická stabilita		Plazmatická stabilita		Mikrosomální stabilita			Rapid Equilibrium dialysis	PAMPA	MDCK-MDR1	Caco-2	
	Čas (min)	Zbývající sloučenina (%)	Čas (min)	Zbývající sloučenina (%)	Čas (min)	Zbývající sloučenina (%)	Vnitřní clearance	Navázaná frakce (%)	log Papp	Kategorie	CNS negativní/positivní	Kategorie
LEM00023566	0	100	0	100	0	100	Nízká	99,35	-7,644	Nízká	CNS negativní	Nízká
	15	101	15	108	15	101					Papp (x10e-6): 0,337	Papp (x10e-6): 0,042
	30	104	30	99	30	97					Efluxní poměr: 3,88	Efluxní poměr: 13,05
	60	102	60	101	60	83					Aktivní eflux: Ano	Aktivní eflux: Ano
	120	94	120	103							% recovery: 102,35	% recovery: 74,22
LEM00023576	0	100	0	100	0	100	Střední	89,56	-6,206	Nízká	CNS negativní	Nízká
	15	97	15	92	15	94					Papp (x10e-6): 1,25	Papp (x10e-6): 0,664
	30	98	30	91	30	71					Eflux ratio: 2,53	Efluxní poměr: 2,07
	60	96	60	92	60	32					Aktivní eflux: Ano	Aktivní eflux: Ano
	120	97	120	90							% recovery: 52,88	% recovery: 54,47
LEM00023578	0	100	0	100	0	100	Nízká	99,38	-8,217	Nízká	CNS negativní	Nízká
	15	102	15	103	15	99					Papp (x10e-6): 0,0366	Papp (x10e-6): 0,0256
	30	101	30	100	30	93					Efluxní poměr: 26,19	Efluxní poměr: 84,51
	60	103	60	103	60	81					Aktivní eflux: Ano	Aktivní eflux: Ano
	120	104	120	92							% recovery: 61,89	% recovery: 20,46

Studované deriváty triterpenů byly nejprve podle validovaných protokolů testovány na jejich stabilitu v daném prostředí. Všechny sloučeniny prokázaly poměrně vysokou jak chemickou stabilitu v roztoku fosfátového pufru, tak plazmatickou stabilitu ve 100 % lidské plazmě, kdy bylo po dvou hodinách inkubace u všech sloučenin přítomno více jako 90 % původního množství látky. Jednotlivé výsledky experimentů plazmatické a chemické stability byly klasifikovány dle interních norem Oddělení farmakologie a toxikologie na UMTM, přičemž byly zohledněny i některé faktory, jako například, zda se jedná o studium ADME vlastností léčiv či jejich proléčiv.

Při tak vysokých hodnotách plazmatické stability byl očekáván i vysoký stupeň vazby těchto látek na bílkoviny plazmy. Tato naše hypotéza pak byla potvrzena metodou rovnovážné dialýzy, která pro oddělení vázané a nevázané frakce využívá polopropustné membrány. U dvou studovaných látek (LEM00023566 a LEM00023578) se po provedení experimentu ukázalo, že jejich vazba na plazmatické bílkoviny vykazovala až 99 % navázané frakce. Takové sloučeniny s vysokou vazností by mohli být zadrženy v krevním řečišti a jejich distribuce do tkání by byla výrazně omezena [van Steeg a kol., 2009]. Za farmakologický a toxický účinek tak v organismu není zodpovědná celková koncentrace léčiva v plazmě, ale pouze jeho volná frakce. Ta frakce, která je nejen schopna interagovat s terapeutickým cílem, ale je rovněž metabolizována a eliminována z těla ven [Sansom a Evans, 1995]. Proto má změna poměru vázané a nevázané frakce látek na plazmatické bílkoviny jistý vliv na jednotlivé farmakokinetické parametry, jako jsou distribuční objem, jaterní clearance a biologická dostupnost látek [Benet a Hoener, 2002]. Stupeň vazby léčiva *in vivo* je mimo jiné ovlivněn přítomností dalších sloučenin, které jsou stejně tak schopny interagovat s plazmatickými proteiny a soutěžit tak s podaným léčivem o vazbu na protein. V důsledku vysoké vaznosti jedné z látek může dojít k vytěsnění látky druhé z proteinu, čímž se v krvi zvýší koncentrace jeho volné frakce, která následně může mít až toxické účinky na organismus [Sansom a Evans, 1995]. Hodnocení míry vazby je proto relevantní zejména při tvorbě farmakokinetických modelů používaných v klinické praxi pro terapeutické monitorování léčiv [Benet a Hoener, 2002]. Vazba látky LEM00023576 na bílkoviny plazmy byla taktéž relativně vysoká, avšak jako jediná nepřesáhla 90 % vázané frakce. Z uvedeného jsme usoudili, že by nemuselo dojít k jejímu zachycení v plazmatickém kompartmentu.

Metabolismus léčiv je jedním z nejdůležitějších farmakokinetických procesů ovlivňujících rozsah a dobu expozice léčiva u člověka [Chao a kol., 2010]. Testem mikrosomální stability bylo stanoveno, do jaké míry jsou studované triterpeny metabolizovány prostřednictvím specifických biotransformačních enzymů. Inkubace látek v přítomnosti NADPH generujícího systému a lidských jaterních mikrosomů, obsahujících membránově vázané enzymy cytochromu P450, nám umožnila vyhodnotit I. fázi metabolismu [McGinnity a kol., 2004]. Po provedení ADME testu byl v závislosti na čase pozorován trend v poklesu koncentrace hned u všech tří sloučenin. Nejnižší stabilitu vykazovala látka uvedená pod názvem LEM00023576, u které byl po hodinové inkubaci pozorován úbytek látky až na 32 % z počáteční koncentrace. Hodnocení metabolické stability s využitím mikrosomálního

systému obvykle předpokládá, že enzymatické reakce probíhají charakteristicky dle kinetiky prvního řádu založené na modelu Michaelise a Mentenové [Chao a kol., 2010].

Naměřená data byla využita pro výpočet vnitřní jaterní clearance (CL_{int}) nevázané frakce léčiva. Naše výsledky byly porovnávány na základě tabelovaných hodnot zpřístupněných na stránkách cyprotexu (výzkumné organizace zaměřující se na *in vitro* ADME testy). Následně byly jednotlivé deriváty podle stupně (rychlosti), jakým by byly dané látky biotransformací eliminovány z krevního oběhu za jednotku času, kategorizovány do jedné ze tří klasifikačních tříd s nízkou, střední či vysokou hodnotou vnitřní clearance. Studované látky LEM00023566 a LEM00023578 byly vyhodnoceny jako poměrně stabilní, potom co byl po ukončení experimentu naměřen pokles jejich koncentrace na 83 %, respektive 81 % z původních 100 % v čase nula. Tyto látky tak podle tabelovaných hodnot spadají do kategorie s nízkou hodnotou vnitřní clearance ($CL_{int} < 8,6$) a nemusely by podléhat rychlému metabolismu enzymy jaterních mikrosomů. Vyšší metabolickou hodnotu pak v průběhu testování vykazovala látka LEM00023576, která byla dle klasifikace zařazena do kategorie látek se středně vysokou hodnotou vnitřní clearance (CL_{int} v rozmezí 8,6 – 47,0). Obecně platí, že by kandidátní látka na léčivo neměla podléhat příliš extenzivnímu metabolismu v hepatocytech, aby v procesu eliminace nebyla vyloučena z těla ještě před tím, než dosáhne systémové cirkulace v množství vykazující požadovaný terapeutický účinek [Tomlin a Brown, 2010]. Pomalu metabolizovaná látka může mít na organismu naopak až toxické účinky, pokud zůstává v krvi příliš dlouho.

Jak je uvedeno v pracích Chao a kol. (2010) a McGinnity a kol. (2004), kromě námi použitých mikrozomálních frakcí se čím dál častěji využívají i čerstvě izolované hepatocyty (hlavně ze zvířecích druhů – potkan, pes, opice) a kryokonzervované hepatocyty (často lidské) pro přesnější predikci *in vivo* jaterní clearance. Publikovaná data poukázala nejen na skutečnost, že všechny xenobiotika metabolizující enzymy, tedy I. i II. fáze metabolismu, jsou obsaženy v intaktní buňce a je kontinuálně produkován redukční faktor (NADPH). Studie však také upozornily na krátkou životnost hepatocytů v suspenzi a na kroky omezující rychlost metabolismu některých sloučenin (vazba na plazmatické proteiny a/nebo buněčný příjem látek prostřednictvím uptake transportérů) [Riley a kol., 2005]. Podle Blanchard a kol. (2004) pak může přítomnost plazmy v mikrosomální směsi vést ke spolehlivějšímu odhadu lidské hepatální clearance.

Jak již bylo zmíněno, propustnost studovaných triterpenů byla v rámci diplomové práce testována hned na několika *in vitro* modelech. Prvně byla ke studiu permeability látek skrze uměle vyrobené polopropustné membrány použita nebuněčná metoda zvaná PAMPA. Permeace látek přes biologické membrány značně souvisí s rozsahem absorpce léčiva u lidí, a proto je tento *in vitro* model pasivní difúze využíván při stanovení transportu látek gastrointestinálním traktem a k predikci penetrace sloučenin přes hematoencefalickou bariéru [Balimane a kol., 2006]. Nicméně s využitím této metody jsme byli schopni hodnotit pouze podíl transcelulárního pasivního transportu látek, a nikoliv jejich transport zprostředkovaný transportními proteiny. Relativní permeabilita látek byla po skončení experimentu stanovena z naměřených koncentrací ve všech kompartmentech. Výsledky byly

klasifikovány podle tabelovaných hodnot uvedených na stránkách cyprotexu. Jak můžeme ve výsledné tabulce vidět, u studovaných látek byla vypočítaná poměrně vysoká záporná hodnota log Papp. Všechny látky tak v průběhu inkubace vykazovaly relativně nízkou schopnost pronikat skrze umělou membránu prostřednictvím pasivní difúze, a proto byly zařazeny do kategorie s nízkou propustností ($\log Papp < -5,0$). Čím vyšší stupeň propustnosti však látka v testu vykazuje, tím je předpokládána vyšší její biologická dostupnost. I přesto nebyla žádná sloučenina vyloučena z našich dalších experimentů, protože existují i jiné transportní mechanismy, kterými mohou molekuly látky pronikat do buněk. Tato teze byla potvrzena i ve studii Pokorný a kol. (2021), kdy jeden z kandidátních derivátů kyseliny betulinové spadal v testu PAMPA do kategorie látek s nízkou permeabilitou a v testech buněčné permeability pak látka vykazovala střední schopnost střevní absorpce a schopnost procházet hematoencefalickou bariérou.

A konečně ke studiu aktivního transportu látek přes biologické membrány byly využity buněčné linie Caco-2 (buňky odvozené z lidského adenokarcinomu tlustého střeva s transportními vlastnostmi podobnými enterocytům) a MDCK-MDR1 (buňky odvozené ze psích epiteliálních buněk ledvin exprimující lidský efluxní transportér). *In vitro* testy permeability Caco-2 a MDCK-MDR1 jsou spolehlivými zavedenými modely střevní a hematoencefalické bariéry, v daném pořadí [Pokorný a kol., 2021]. V rámci experimentální části jsme testovali potenciál interakce našich studovaných triterpenů s efluxními transportéry, které mohou ovlivňovat farmakokinetické vlastnosti látek. Nejprve byl pro všechny látky vypočítán zdánlivý koeficient propustnosti. V experimentech s Caco-2 buňkami jsou látky podle schopnosti střevní absorpce, tedy podle jejich výsledných hodnot $Papp_{(AB)}$, řazeny do tří možných kategorií (nízká, střední, vysoká). Všechny tři studované triterpeny však v našich experimentálních podmínkách vykazovaly malou schopnost procházet skrze vytvořenou buněčnou monovrstvu a byly tak zařazeny do kategorie látek s nízkou propustností ($Papp_{(AB)} < 5 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$). Studie s MDCK-MDR1 buňkami potom rozdělují látky na základě potenciálu procházet hematoencefalickou bariérou na CNS pozitivní či CNS negativní. Nicméně i v těchto testech se opět všechny triterpeny vyznačovaly nízkou permeabilitou a byly tak označeny jako CNS negativní ($Papp_{(AB)} < 10 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$). Caco-2 a MDCK-MDR1 diferencované monovrstvy byly použity pro transportní studie pouze v případě, že byly dostatečně intaktní, jak bylo potvrzeno luciferázovým testem.

Rychlost transportu látek přes MDCK-MDR1 a Caco-2 buněčné monovrstvy byla hodnocena v obou směrech (od apikální k bazolaterální (AB) a od bazolaterální k apikální (BA)), což nám umožnilo určit efluxní poměr (ER), který nám ukazuje, zda sloučenina podléhá aktivnímu efluxu z buňky či nikoliv [Pokorný a kol., 2021]. Studované triterpeny byly v obou buněčných modelech aktivně exportovány z buněk ven, jak nám indikují efluxní poměry $E > 2$. Je třeba si také uvědomit, že například P-gp transportér vykazuje vyšší hladinu exprese v membránách Caco-2 buněčné linie v porovnání se situací *in vivo* [Dressman a kol., 2008], která může způsobit nižší propustnost v absorpčním směru. Permeabilita látek, jejichž transport je umožněn pomocí tohoto nosiče, proto často bývá v Caco-2

buňkách nižší než ve skutečnosti v lidském tenkém střevě. Exprese P-gp v podmínkách buněčných kultur může být indukována hned několika faktory, jakou jsou například xenobiotika, stres prostředí, hormony a diferenciacní látky. Substrátová specifita P-gp se navíc kvůli genetickému polymorfismu může lišit napříč populacemi [Estudante a kol., 2013].

Studie Li a kol. (2008) naznačuje, že buněčný příjem látek zprostředkovaný pasivní difúzí a/nebo buněčnými transportéry může být krokem omezujícím rychlost metabolismu v játrech. Obecně sloučeniny s nízkou permeabilitou membrán tak mohou vykazovat nízkou clearance *in vitro* a mohou mít taktéž potíže s dosažením svého intracelulárního cíle [Li a kol., 2008]. V souladu s tímto tvrzením můžeme poznamenat, že naše dvě látky LEM00023566 a LEM00023578, které v *in vitro* testech permeability vykazovaly nízký stupeň propustnosti, nepodléhaly ani rychlému metabolismu enzymy jaterních mikrosomů.

7 ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že studované triterpeny v našich experimentálních podmínkách vykazovaly velice dobrou stabilitu jak ve fosfátovém pufru, tak v lidské plazmě. V průběhu testování tak látky nepodléhaly degradaci vlivem neenzymatických ani enzymatických procesů. Proto by pravděpodobně mohlo ve farmakologicky aktivní formě dosáhnout systémové cirkulace relativně vysoké procento látky z podané dávky. V testech mikrosomální stability podléhala rychlému metabolismu pouze látka LEM00023576, ostatní dvě látky byly v přítomnosti mikrosomálních enzymů vyhodnoceny jako poměrně stabilní. Obvykle pak kvůli rychlé metabolizaci aktivní látky není snadné dosáhnout terapeuticky účinné koncentrace v organismu, a je tak potřeba podávat vyšší než běžné dávky tohoto léčiva. V neposlední řadě třeba zmínit, že metodou rovnovážné dialýzy byl stanoven vysoký stupeň vazby těchto látek na bílkoviny plazmy.

Studované látky však v žádných našich ADME testech nedosáhly dobrých výsledků permeability. V nebuněčné metodě PAMPA látky vykazovaly relativně nízkou schopnost pronikat skrze umělou membránu prostřednictvím pasivní difúze. Stejně tak látky nebyly dostatečně schopné prostupovat skrze vytvořenou Caco-2 buněčnou monovrstvu. A v testech s MDCK-MDR1 buňkami byly označeny jako CNS negativní. Podle všeho byly v obou buněčných modelech látky aktivně vypuzovány z buněk ven efluxními transportéry, pravděpodobně P-gp, jak nám poukazují efluxní poměry $E > 2$.

Změnou funkční skupiny nebo její polohy ve struktuře však může dojít ke zlepšení vlastností těchto látek, např. permeability. Studium vztahů mezi chemickou strukturou molekuly a její biologickou aktivitou se zabývá tzv. SAR (structure activity relationship analysis) analýza, která umožňuje detekci funkční skupiny odpovědné za požadovaný farmakologický a terapeutický účinek na organismus [URL 2]. Modifikací našich studovaných látek, jejichž rizika jsou nám již známá, by mohlo dojít ke změně jejich biologických účinků a případně by se mohli stát vedoucími kandidáty ve vývoji nových léčiv.

8 LITERATURA

- Abdel-Rahman S. M, Kauffman R. E. (2004): The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics: understanding dose–response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44:111–36.
- Artursson P., Palm K., Luthman K. (2001): Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.*1;46(1-3):27-43.
- Audus K. L., Bartel R. L., Hidalgo I. J., Borchardt R.T. (1990): The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm Res.* 7:435–451.
- Balimane P. V., Han Y. H., Chong S. (2006): Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *AAPS J.* 8:E1-13.
- Bendayan R., Lee G., Bendayan M. (2002): Functional expression and localization of P-glycoprotein at the blood brain barrier. *Microsc Res Tech* 57(5):365-80.
- Benet L. Z., Hoener B. A. (2002): Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 71(3):115-21.
- Blanchard N., Richert L., Notter B., Delobel F., David P., Coassolo P., Lavé T. (2004): Impact of serum on clearance predictions obtained from suspensions and primary cultures of rat hepatocytes. *Eur J Pharm Sci.*23(2):189-99
- Borková L., Frydrych I., Jakubcová N., Adámek R., Lišková B., Gurská S., Medvedíková M., Hajdúch M., Urban M. (2020): Synthesis and biological evaluation of triterpenoid thiazoles derived from betulonic acid, dihydrobetulonic acid, and ursonic acid. *Eur J Med Chem.* 185:111806.
- Braun A., Hämmerle S., Suda K., Rothen-Rutishauser B., Günthert M., Krämer S. D., Wunderli-Allenspach H. (2000): Cell cultures as tools in biopharmacy. *Eur J Pharm Sci.* 11 Suppl 2:S51-60.
- Burton P. S, Conradi R. A, Hilgers A.R, Ho N. F. (1993): Evidence for a polarized efflux system for peptides in the apical membrane of Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 15;190(3):760-6.
- Carlson T. J., Fisher M., B. (2008): Recent advances in high-throughput screening for ADME properties. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 11(3), 258–264.
- Chao P., Uss A. S., Cheng K. C. (2010): Use of intrinsic clearance for prediction of human hepatic clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*6(2):189-98.
- Chen Z., Shi T., Zhang L., Zhu P., Deng M., Huang C., Hu T., Jiang L., Li J. (2016): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.* 370(1):153-64.
- Danso D., Jannetto P. J., Enger R., Langman L. J. (2015): High-throughput validated method for the quantification of busulfan in plasma using ultrafast SPE-MS/MS. *Ther. Drug Monit.*37,319-24.

- de Aizpurua H. J., Russell-Jones G. J. (1988): Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J Exp Med.* 167(2):440-51.
- Delie F., Rubas W. (1997): A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 14(3):221–286.
- Di L., Kerns E. H., Fan K., McConnell O. J., Carter G. T. (2003): High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur J Med Chem.* 38(3):223-32.
- Dressman J. B., Thelen K., Jantravid E. (2008): Towards quantitative prediction of oral drug absorption. *Clin Pharmacokinet.* 47:655-67.
- Dukes J. D., Whitley P., Chalmers A. D. (2011): The MDCK variety pack: choosing the right strain. *BMC Cell Biol.* 7;12:43.
- Džubák P., Hajdúch M., Vydra D., Šarek J., Cwiertka K. (2004): Biologické účinky triterpenoidů: protizánětlivé, antimikrobiální, hepatoprotektivní, analgetické a další farmakologické aktivity. *Klin Farmakol Farm.* 18(2):96-101.
- Estudante M., Morais J. G., Soveral G., Benet L. Z. (2013): Intestinal drug transporters: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 65(10):1340-56.
- Fan J., De Lannoy I. A. (2014): Pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol.* 87:93-120.
- Feng B., West M., Patel N. C., Wager T., Hou X., Johnson J., Tremaine L., Liras J. (2019): Validation of Human MDR1-MDCK and BCRP-MDCK Cell Lines to Improve the Prediction of Brain Penetration. *J Pharm Sci.* 108(7):2476-2483.
- Fossati L., Dechaume R., Hardillier E., Chevillon D., Prevost C., Bolze S., Maubon N. (2018): Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay of lipophilic drugs. *Int J Pharm.* 360:148-55.
- Giacomini K. M., Huang S. M. (2013): Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther.* 94(1):3-9.
- Giacomini K. M., Sugiyama Y. (2011): Membrane transporters and drug response. In: Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C. (Ed.), *Goodman and Gilman's Pharmacological basis of therapeutics*. 12th edition. McGraw Hill Companies, New York, s. 89–121.
- Goodman L., Gilman A., Brunton L., Lazo J., Parker K. (2006): *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill.
- Gottesman M. M., Fojo T., Bates S. E. (2002): Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer.* 2(1):48-58.
- Grote-Koska D., Czajkowski S., Brand K. (2015): Performance of the new RapidFire system for therapeutic monitoring of immunosuppressants. *Ther. Drug Monit.*, 37,400-4.
- Hacker M, Bachmann K, Messer W. (2009): *Pharmacology. Principles and practice*. London: Elsevier, 2009; 113–127.

- Hajdúch M., Džubák P., Šarek J. (2004): Biologické účinky triterpenoidů: protinádorová aktivita. *Klin Farmakol Farm.* 18(1):14-21.
- Hilgendorf C., Spahn-Langguth H., Regårdh C. G., Lipka E., Amidon G. L., Langguth P. (2000): Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm Sci.* 89(1):63-75.
- Hodgson J. (2001): ADMET-turning chemicals into drugs. *Nat Biotechnol.* 19(8):722-6.
- Jian W., Romm M. V., Edom R. W., Miller V. P., LaMarr W. A., Weng N. (2011): Evaluation of a High-Throughput Online Solid Phase Extraction – Tandem Mass Spectrometry System for In Vivo Bioanalytical Studies. *Anal. Chem.*, 83(21):8259-8266.
- Juliano R. L., Ling V. (1976): A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochim. Biophys. Acta* 455,152–162.
- Karlsson J., Kuo S. M., Ziemniak J., Artursson P. (1993): Transport of celiprolol across human intestinal epithelial (Caco-2) cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1009–1016.
- Kansy M., Senner F., Gubernator K. (1998): Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem.* 41(7): 1007–10.
- Kerns E. H., Di L., Petusky S., Farris M., Ley R., Jupp P. (2004): Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J Pharm Sci.* 93(6):1440-53.
- Kim D. S., Pezzuto J. M., Pisha E. (1998): Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg Med Chem Lett.* 8(13):1707-12.
- Klaassen C. D., Aleksunes L. M. (2010): Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation. *Pharmacol. Rev.* 62(1):1–96.
- König J., Müller F., Fromm M. F. (2013): Transporters and drug-drug interactions: important determinants of drug disposition and effects. *Pharmacol Rev.* 17;65(3):944-66.
- Korman, E., Langman, L. J., Jannetto, P. J. (2015): High-throughput method for the quantification of lacosamide in serum using ultrafast SPE-MS/MS. *Ther. Drug Monit.* 37,126-31.
- Kubeš J., Tůmová L., Martin J. (2016): Transport sekundárních metabolitů přes rostlinné membrány. *Chem. Listy.* 110, 26-30.
- Li C., Nair L., Liu T., Li F., Pichardo J., Agrawal S., Chase R., Tong X., Uss A. S., Bogen S., Njoroge F. G., Morrison R. A., Cheng K. C. (2008): Correlation between PAMPA permeability and cellular activities of hepatitis C virus protease inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 75(5):1186-97.
- Lin J., Sahakian D. C., De Morais S. M., Xu J. J., Polzer R. J., Winter S. M. (2003): The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. *Curr Top Med Chem,* 3:1125-54.

- Lin J. H., Lu A.Y. (1997): Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev.* 49(4):403-49. PMID: 9443165.
- Ludwiczuk A., Skalicka-Woźniak K., Georgiev M. I. (2017): Terpenoids. *Pharmacognosy.* 233-266.
- Martínková J. (2007): *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. Praha: Grada Publishing.* ISBN 978-80-247-1356-4.
- McGinnity D. F., Soars M. G., Urbanowicz R. A., Riley R. J. (2004): Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as in vitro drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metab Dispos.* 32(11):1247-53.
- Nies A. T., Schwab M., Keppler D. (2008): Interplay of conjugating enzymes with OATP uptake transporters and ABC/MRP efflux pumps in the elimination of drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 4(5):545-68.
- Nosková V., Hajdúch M., Mihál V., Cwiertka K. (2000): Mechanismy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi II. *Klin Onkol.* 13:10-17.
- Patočka J., Stiborová M. (2004): Kyselina betulibová: perspektivní cytostatikum. *Chem. Listy.* 98, 185-187.
- Petronelli A., Pannitteri G., Testa U. (2009): Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anticancer Drugs.* 20(10):880-92.
- Pokorný J., Borková L., Urban M. (2018): Click Reactions in Chemistry of Triterpenes - Advances Towards Development of Potential Therapeutics. *Curr Med Chem.* 25(5):636-658.
- Pokorný J., Olejníková D., Frydrych I., Lišková B., Gurská S., Benická S., Šarek J., Kotulová J., Hajdúch M., Džubák P., Urban M. (2021): Substituted dienes prepared from betulinic acid - Synthesis, cytotoxicity, mechanism of action, and pharmacological parameters. *Eur J Med Chem.* 224:113706.
- Raisova M., Hossini A. M., Eberle J., Riebeling C., Wieder T., Sturm I., Daniel P. T., Orfanos C. E., Geilen C. C. (2001): The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol.* 117(2):333-40.
- Riley R. J., McGinnity D. F., Austin R. P. (2005): A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab Dispos.* 33(9):1304-11.
- Rowland M., Tozer M. (1995): Absorption and Distribution Kinetics. In *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications.* Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams &Wilkins.
- Ruell J. (2003): Membrane-based drug assays Permeability assays and oral absorption modeling can make the difference between drugs and dregs. *Modern drug discovery* [online]. Dostupné na: <http://pubsapp.acs.org/subscribe/archive/mdd/v06/i01/pdf/103toolbox.pdf> (cit. 30. 3. 2021).
- Sansom L. N., Evans A. M. (1995): What is the true clinical significance of plasma protein binding displacement interactions? *Drug Saf.* 12(4):227-33.

- Schinkel A. H., Jonker J. W. (2003): Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 55(1):3-29.
- Shibayama Y., Iwashita Y., Yoshikawa Y., Kondo T., Ikeda R., Takeda Y., Osada T., Sugawara M., Yamada K., Iseki K. (2011): Effect of 5-fluorouracil treatment on SN-38 absorption from intestine in rats, *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1418–1425.
- Smith D. A., van de Waterbeemd H. (1999): Pharmacokinetics and metabolism in early drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* 3(4):373-8. doi: 10.1016/s1367-5931(99)80056-8.
- Snoeck V., Goddeeris B., Cox E. (2005): The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and Infection.* 7(7-8):997-1004.
- Tomlin M., Brown D. (2010): *Pharmacokinetic Principles. Pharmacology & Pharmacokinetics: A Basic Reader.* Springer, London.
- Tucker T. G., Milne A. M., Fournel-Gigleux S., Fenner K. S., Coughtrie M. W. (2012): Absolute immunoquantification of the expression of ABC transporters P-glycoprotein, breast cancer resistance protein and multidrug resistance-associated protein 2 in human liver and duodenum. *Biochem. Pharmacol.* 83, 279–285.
- van Steeg T. J., Boralli V. B., Krekels E. H., Slijkerman P., Freijer J., Danhof M., de Lange E. C. (2009): Influence of plasma protein binding on pharmacodynamics: Estimation of in vivo receptor affinities of beta blockers using a new mechanism-based PK-PD modelling approach. *J Pharm Sci.* 98(10):3816-28.
- van Breemen R. B., Li Y. (2005): Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 1(2):175-185.
- Veach B. T., Mudalige T. K., Rye P. (2017): RapidFire mass spectrometry with enhanced throughput as an alternative to liquid-liquid salt assisted extraction and LC/MS analysis for sulphonamides in honey. *Anal. Chem.* 89, 3256-60.
- Volpe D. A. (2007): Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. Published online in Wiley InterScience.
- Volpe D.A. (2011): Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Med. Chem.* 3(16), 2063–2077.
- Vrbanac J., Slauter R. (2013): ADME in drug discovery. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development.* Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387815-1.00002-2>.
- Wang Q., Rager J.D., Weinstein K., Kardos P. S., Dobson G. L., Li J., Hidalgo I. J. (2005): Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int J Pharm.* 288(2):349-59.
- Yan Z., Caldwell G. W., Jones W. J., Masucci J. A. (2003): Cone voltage induced in-source dissociation of glucuronides in electrospray and implications in biological analyses. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 17(13):1433-42.

Zhou M., Zhang R. H., Wang M., Xu G. B., Liao S. G. (2017): Prodrugs of triterpenoids and their derivatives. *Eur J Med Chem.*131:222-236.

Internetové zdroje:

URL 1. Cyprotex – *In vitro* ADME [Online]. Dostupné na: <https://www.cyprotex.com/admepk> (cit. 20.2.2022)

URL 2. SAR analýza [Online]. Dostupné na: <https://www.creative-proteomics.com/services/structure-activity-relationship-sar-analysis.htm> (cit. 17.4.2022).