

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Analýza obsahu oximu K870 a jeho metabolitů v biologických vzorcích
metodou HPLC-MS**

Diplomová práce

Autor: Bc. Petr Bzonek
Studijní program: N1407 Chemie
Studijní obor: Bioorganická chemie a toxikologie škodlivin
Vedoucí práce: PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D.

Hradec Králové

květen 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem vycházel.

V Hradci Králové dne 13. 5. 2019

Bc. Petr Bzonek

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval institucionální podpoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Hradec Králové. Práce byla podpořena projektem Specifického výzkumu (SV2018-2115). Rovněž bych velice rád poděkoval vedoucímu své diplomové práce PharmDr. Rudolfu Andrýsovi, Ph.D. za odborné vedení, velmi užitečné rady, vstřícný přístup a nesmírnou ohleduplnost po celou dobu vedení. Dále bych rád poděkoval své rodině a kamarádům za podporu během celého studia. A v neposlední řadě mé poděkování patří všem členům Katedry chemie Univerzity Hradec Králové, za přínosné rady a vytváření přátelské atmosféry po celou dobu mého studia.

Anotace

BZONEK, P. *Analýza obsahu oximu K870 a jeho metabolitů v biologických vzorcích metodou HPLC-MS*. Hradec Králové, 2019. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Rudolf Andrýs. 65 s.

Organofosfátové sloučeniny jsou syntetizovány již řadu desítek let, za účelem využití zejména v zemědělském průmyslu, jako pesticidy a vojenském průmyslu, jako bojové látky s nervově paralytickým účinkem. Jejich hlavním účinkem je narušení nervové synapse u hmyzu a tím jejich zahubení. Mnoha studiemi však bylo prokázáno, že organofosfáty mají značný dopad také na člověka. Mohou způsobovat poškození ledvin, nervové soustavy, plic a mnoho dalších orgánových struktur. Během zasažení lidského organismu dochází k narušení homeostázy, což vede k nadměrné produkci reaktivních forem kyslíku a rozvinutí oxidativního stresu. Všechny tyto komplikace pak mohou vyústit až v rozvinutí Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. V dnešní době se jedná o onemocnění, která postihují stále větší procento populace. Jejich léčba však dosud nebyla objasněna, proto existuje několik vědeckých skupin, které se zabývají syntézou a následnou analýzou oximů, jako potenciálních léčiv při zasažení organismu organofosfáty. Proto je i tato práce zaměřena na oxim K870, jako potenciální léčivo těchto otrav.

Klíčová slova:

Organofosfát, acetylcholinesteráza, oxim K870, farmakokinetika, chromatogram

Annotation

BZONEK, P. *Analysis of the K870 oxime and its metabolites in biological samples by HPLC-MS*. Hradec Králové, 2019. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Rudolf Andrýs. 65 s.

Organophosphates are for several decades synthesized in purpose of use in the agricultural industry, such as pesticides and in the military industry such as warfare agents with a nerve-paralytic effect. Their main mechanism of action is affecting the insect nerve synapse which leads to their death. Many studies have shown that organophosphates also have a significant impact on humans as well as on insect. They can cause damage of kidneys, nerve system, lungs and many others structures in the body. The exposure of organophosphates can disrupt the balance of homeostasis what leads to excessive production of reactive oxygen species and development of oxidative stress. All these complications may result in the development of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Nowadays, these diseases affecting an increasing percentage of the population. However, their treatment has not been elucidated, so there are several scientific groups that deal with the synthesis and subsequent analysis of oximes as potential drugs in the organophosphates poisoning. Therefore, this work is focused on the K870 oxime as a potential drug for these poisoning.

Keywords:

Organophosphates, acetylcholinesterase, oxime K870, pharmacokinetics, chromatogram

Seznam použitých zkratek

Ac CoA	acetylkoenzym A
ACN	acetonitril
AD	Alzheimerova choroba
Ach	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
BBB	hematoencefalická bariéra
BChE	butyrylcholinesteráza
CN kolona	kyano kolona
CNS	centrální nervová soustava
COPIND	chronická neuropsychická porucha indukovaná organofosfátem
DAD	detektor diodového pole
FA	kyselina mravenčí
GSH	glutathion
hAChE	lidská acetylcholinesteráza
HILIC	hydrofilní interakční kolona
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IMS	intermediární syndrom
IPS	Idiopatická Parkinsonova choroba
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MF	mobilní fáze
MRM	multiple reaction monitoring mód
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická rezonance
OP	organofosfát
OPIDP	opožděná polyneuropatie indukovaná organofosfátem
OPs	organofosfátové sloučeniny
PD	Parkinsonova choroba
PFP kolona	pentafluorofenyl propylová kolona
ROS	reaktivní formy kyslíku
SF	stacionární fáze

OBSAH

Úvod.....	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Organofosfáty a jejich deriváty	10
1.1.1 Oxidativní stres jako subchronický projev expozice OPs	12
1.1.2 Nefrotoxický účinek organofosfátů a jejich derivátů	13
1.1.3 Neurotoxický účinek organofosfátů a jejich derivátů.....	13
1.2 Neurotransmitery a ovlivnění jejich funkcí.....	16
1.2.1 Alzheimerova choroba (Alzheimer disease-AD).....	18
1.2.2 Parkinsonova choroba (Parkinson´s disease-PD)	20
1.3 Farmakokinetika a farmakodynamika léčiv	21
1.3.1 Prostupnost hematoencefalické bariéry pro reaktivátory AChE.....	25
1.3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti a farmakologické parametry vybraných oximů	29
1.4 Odběr a úprava vzorků před vlastní analýzou.....	32
2 CÍLE PRÁCE	33
3 MATERIÁLY A METODY	34
3.1 Biologický materiál.....	34
3.1.1 Myší tkáňové vzorky	34
3.1.2 Lidské jaterní mikrozomy a cytosol.....	34
3.2 Chemikálie	34
3.3 Přístrojové vybavení.....	35
3.4 Metody	35
3.4.1 Inkubace mikrozomálních a cytosolických frakcí s oximem K870.....	35
3.4.2 Extrakce oximu K870 z biologických vzorků	36
3.4.3 Chromatografická UHPLC-MS analýza biologických vzorků.....	36
3.4.4 Spektrofotometrické stanovení nekalibrované čistoty oximu K870.....	37
4 Výsledky a diskuze.....	38
4.1 Tvorba LC-MS metody	40
4.1.1 Nastavení MRM přechodů.....	40
4.1.2 Chromatografická analýza oximu K870 na C ₈ a C ₁₈ koloně	41
4.1.3 Chromatografická analýza oximu K870 na Pentafluorofenyl propylové koloně (PFP).....	43

4.1.4	Chromatografická analýza oximu K870 na kyano koloně (CN kolona) ..	44
4.1.5	Chromatografická analýza oximu K870 na Hydrofilní interakční koloně (HILIC kolona).....	45
4.1.6	Zpracování biologických vzorků	47
4.2	Analýza farmakokinetiky oximu K870	48
4.2.1	Analýza oximu K870 v plazmě	48
4.2.2	Analýza oximu K870 v ledvinách	49
4.2.3	Analýza oximu K870 v moči	50
4.2.4	Analýza oximu K870 v játrech a žluči.....	51
4.3	Farmakodynamika oximu K870.....	52
Závěr	56
5	Seznam použité literatury	57

ÚVOD

Organofosfátové sloučeniny jsou významnou skupinou látek, využívaných především jako pesticidy v zemědělství a ve vojenském průmyslu jako bojové látky, s nervově paralytickým účinkem. Jejich mechanismem účinku je inhibice aktivity acetylcholinesterázy, která zodpovídá za štěpení acetylcholinu v nervových synapsích. Inhibicí acetylcholinesterázy dochází ke zvýšení koncentrace acetylcholinu v nervových zakončeních, čímž může dojít k rozvinutí endogenní toxicity acetylcholinem, jako hlavní příčiny toxického účinku organofosfátů.

Současné studie usilují o vyvinutí léčiv, tzv. reaktivátorů acetylcholinesterázy s univerzálním účinkem vůči organofosfátovým xenobiotikům. Obrovským přínosem pro léčbu těchto otrav je kombinovaná léčba atropinem, diazepamem a vhodným oximem. Právě oximy jsou látky, s předpokládaným terapeutickým účinkem, zejména pak se schopností reaktivace inhibované acetylcholinesterázy. Protože se jedná o látky s teoretickou schopností prostupovat hematoencefalickou bariéru, je jejich syntéza stále žádoucí, a proto se i tato diplomová práce zabývá oximem K870, jako potenciálním reaktivátorem acetylcholinesterázy.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Organofosfáty a jejich deriváty

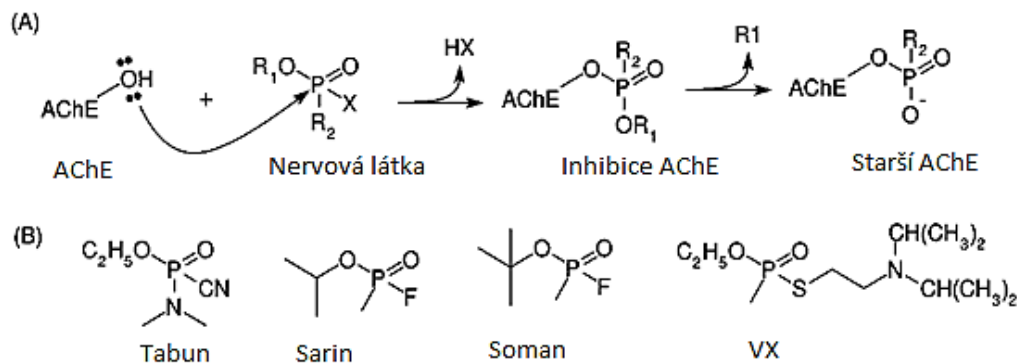
Termín organofosfáty (OP) označuje různorodou skupinu sloučenin, které jsou odvozeny od kyseliny fosforečné, fosfonové a fosfinové. Prototypové organofosfátové sloučeniny (OPs) byly poprvé syntetizovány v 19. století a jejich příbuzné sloučeniny jsou nyní součástí mnoha produktů, jež jsou používány po celém světě (Naughton, et al., 2018). Mezi takové řadíme pesticidy, insekticidy, fungicidy, herbicidy, defolianty, průmyslová rozpouštědla, maziva, přísady do paliv, léky na předpis a bojové látky (př. sarin a soman) (Sean, et al., 2018).

Organofosfátové sloučeniny, které nejsou primárními pesticidy, vykazují inhibiční účinek vůči acetylcholinesteráze (AChE). Působením těchto látek na organismus dochází k inhibici hydrolýzy neurotransmiteru acetylcholinu (ACh), což vede k jeho kumulaci v neuromuskulární synapsi (Dardiotis, et al., 2019). Působením OPs dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi serinovým zbytkem aktivního místa AChE a atomem fosforu organofosfátového inhibitoru (Obr. 1). Inhibice AChE vede k nadměrné stimulaci cholinergního receptoru v synapsi, což v konečném důsledku způsobuje ztrátu neuromuskulární funkce (Karade, et al., 2014).

K obnově funkce AChE slouží oximy, které reaktivují fosforylované cholinesterázy vytěsněním fosforylované skupiny z enzymu, díky své vysoké afinitě k enzymu a zároveň na základě jejich silné nukleofility. V procesu reaktivity vznikají defosforylovaný enzym a fosforylované oximy, doprovázené obnovou aktivity enzymu. Reaktivace je možná pouze tehdy, kdy esterové substituenty na fosforu nejsou hydrolyzovány (tzn., pokud nedochází ke stárnutí fosforylovaného enzymu). Rychlost reaktivity pak závisí na: struktuře fosforylové skupiny vázané na enzym, zdroji enzymu, struktuře a koncentraci oximu, který je přítomen v aktivním místě AChE a v neposlední řadě na post – inhibiční dealkylaci známé jako stárnutí enzymu. Fosforylované oximy, vzniklé během procesu reaktivity, mohou být účinnými inhibitory cholinesteráz, které by mohly způsobovat opětovnou inhibici reaktivovaného enzymu (Jonaković, et al., 2006).

Studium farmakokinetických a farmakodynamických parametrů nově syntetizovaných oximů, popřípadě použitých organofosfátů zahrnuje jak experimentální, tak teoretické přístupy. Experimentální aspekt představuje vývoj biologických technik odběru vzorků, analytické metody pro měření léčiv a jejich metabolitů, a v neposlední

řadě sběr a manipulaci s daty. Teoretický přístup se zaměřuje na vývoj farmakokinetických a farmakodynamických modelů, které předpovídají účinky léčiva po jeho podání společně se změnou fyziologie organismu (Shargel, et al., 2015).



Obr. 1: (A) Obecný mechanismus inhibice AChE nervovými látkami. Odstupující skupina X (F-, CN-, a další), skupina R1 (alkyl Obr. 1 nebo dialkylamin), skupina R (alkyl, cykloalkyl a další). (B) Chemická struktura vybraných nervových látek (Vital de Oliveira, et al., 2018).

Organofosfátové sloučeniny patří mezi nejtoxičtější látky. K intoxikaci nejčastěji dochází inhalací, ale také přes kůži, kdy OP reagují s keratinem v kožním epitelu. Transdermální intoxikace je tak jednou z nejzávažnějších otrav. Světová zdravotnická organizace uvádí, že ročně trpí akutní intoxikací OP až 3 milióny lidí. Při transdermální intoxikaci, mohou OPs způsobovat poškození reprodukčního a imunitního systému. Dále mohou způsobovat rakovinu pankreatu, jater, krve a jiných orgánů (Vitola, et al., 2019). Toxicitu OPs můžeme rozdělit na: akutní (≤ 24 hodin), subakutní (≤ 28 dní), subchronickou (< 90 dní) a chronickou (≥ 90 dní) (Georgiadis, et al., 2018). Akutní toxicita se projevuje především ireverzibilní inhibicí lidské AChE v cholinergní synapsi a v nervosvalovém spojení (Leroy-Trovaslet, et al., 2011). Dále pak zvýšenou salivací, lakrimací, gastrointestinálními potížemi, zvracením, sípáním, arytmií, křečemi, až smrtí v důsledku zástavy dýchání nebo srdečního rytmu. Mezi chronické a subchronické příznaky řadíme především aterosklerózu, kardiovaskulární onemocnění a oxidativní stres, zejména u mladých jedinců (Georgiadis, et al., 2018).

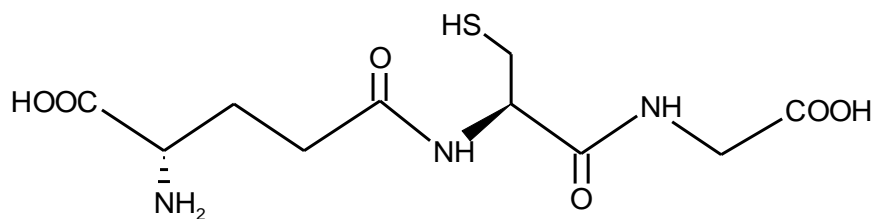
1.1.1 Oxidativní stres jako subchronický projev expozice OPs

Při subchronické nebo chronické expozici OPs, mluvíme o nadměrné produkci reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species-ROS), které narušují homeostázu organismu. Tyto radikály vznikají zejména metabolickou přeměnou OPs v přítomnosti cytochromu P450 (Hussain-Lukaszewicz, 2010). Jedná se o širokou skupinu cytochromů, které jsou rozděleny na jednotlivé izoenzymy s označením CYP1–4. Enzymy ze skupiny cytochromu P450 zodpovídají za většinu biotransformačních pochodů v organismu. Během těchto reakcí dochází nejčastěji k hydroxylaci, deaminaci, dealkylaci, dehalogenaci a dalším významným přeměnám xenobiotik (Lock, et al., 1998).

K nadměrné tvorbě ROS při OP toxicitě může docházet vlivem vysoké spotřeby energie, která je spojená s inhibicí oxidativní fosforylace. Během tohoto procesu, dochází k uvolňování glukózy indukci glykogenolýzy v játrech. Celý proces vede ke zvýšené produkci adenosintrifosfátu, za účelem vyrovnání energetických potřeb organismu. Z tohoto důvodu, může docházet k nadměrné tvorbě ROS v různých orgánech (Hussain-Lukaszewicz, 2010).

Kyslíkové radikály jsou nestabilní a vysoce reaktivní částice. Jejich reaktivitu zajišťuje přítomnost jednoho a více nepárových elektronů, které hledají stabilitu v tvorbě vazby s okolními molekulami. Všechny hlavní biomolekuly, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, mohou podléhat oxidativním účinkům ROS (Sinha, et al., 2015).

Hlavní antioxidační složkou, snižující hladinu těchto radikálů v organismu, je glutathion (GSH). Jedná se o endogenní tripeptid (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin) a jeden z nejdůležitějších intracelulárních antioxidantů (Franklin, et al., 2009). V těle se glutathion vyskytuje z pravidla ve dvou formách: v redukované podobě jako thiol - GSH, popřípadě v oxidované formě jako disulfid. Koncentrace GSH je nejvyšší v játrech a renálních tubulárních buňkách. V těchto cílových orgánech zodpovídá především za detoxikaci cizorodých látek, doprovázenou jejich biotransformací (Lu, 2009). Při biotransformaci dochází k reakci thiolové (-SH) skupiny glutathionu, s elektrofilními sloučeninami (Obr. 2). Reakce probíhá buď přímo nebo za přítomnosti glutathion-S-transferáz. (Nýdlová, et al., 2014).



Obr. 2: Strukturální vzorec glutathionu.

1.1.2 Nefrotoxický účinek organofosfátů a jejich derivátů

Toxický účinek OPs zasahuje několik orgánů, jako jsou: nervový systém, kosti, štítná žláza, ledviny, játra a mnoho dalších. Široká škála toxického účinku OPs je dána především jejich lipofilním charakterem, který zajišťuje vazbu mezi organofosfátem a buněčnou membránou. Interakcí dochází k narušení fosfolipidové dvojvrstvy a poškození viscerálních orgánů. Ledviny jsou cílovým orgánem pro studii účinku OPs při akutní, subakutní a chronické expozici. Během analýzy nefrotoxického působení organofosfátů, jsou brány v potaz, změny fyziologie relativní hmotnosti ledvin, objemu ledvin a hladiny exkrece sodných iontů (Samet-Mahjoubi, et al., 2008).

Akutní poškození ledvin v důsledku expozice OPs je vysoce rizikovým faktorem ohrožující život pacientů. Vyznačuje se vysokou morbiditou, zapříčiněnou sníženou schopností toto poškození diagnostikovat. Renální poškození je ve většině případů doprovodným symptomem při neurotoxických a respiračních OP intoxikacích. Obecně není nefrotoxický mechanismus OP detailně popsán. Existují však studie, které pozorovaly změny ledvin u potkanů. Mezi pozorované změny patří: smrštěné glomeruly, rozšířené močové cesty, infiltrace zánětlivých buněk v intersticiální tkáni, pyknotická jádra, hyalinní hmota v lumen některých tubulů, dilatace cév, cytoplazmatická degradace renálních tubulů a ruptura Bowmanova váčku (Georgiadis, et al., 2018).

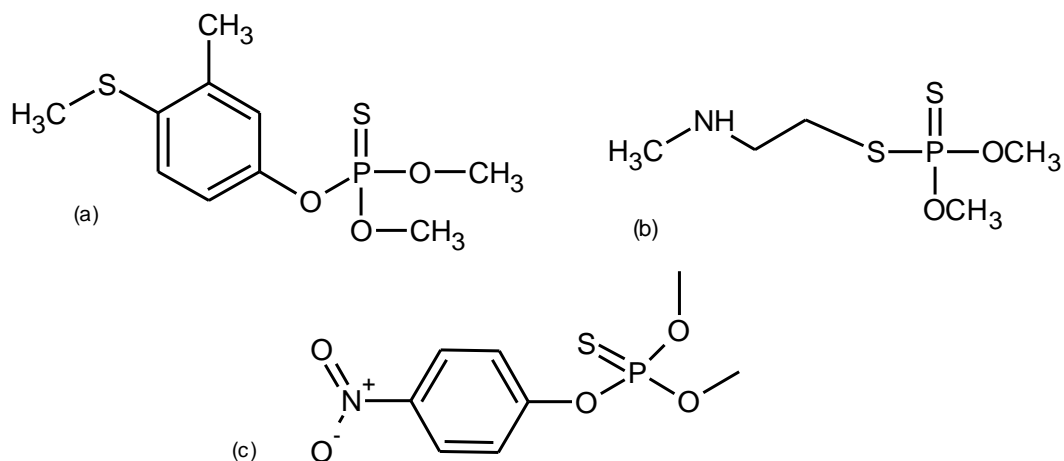
1.1.3 Neurotoxický účinek organofosfátů a jejich derivátů

Vyvíjení insekticidních látek, bylo zaměřeno především na ochranu zemědělských produktů před hmyzem a jinými škůdci. Hlavním mechanismem účinku insekticidů je poškodit nervový systém hmyzu. Tento účinek však nerozvíjí neurotoxicitu pouze u živočichů, nýbrž i u lidí. Vysoká citlivost nervového systému vůči insekticidním přípravkům se projevuje během prenatálního, postnatálního i adolescentního vývoje. Dopady na vyvíjející se nervový systém se mohou projevit v průběhu celého života

jedince. I později po přerušení expozice toxické látky se mohou projevovat dříve vyvolané malformace, ústící v dysfunkce v chování (Villaça-Abreu, et al., 2019).

Organofosfáty způsobují u lidí čtyři hlavní neurotoxické poruchy: cholinergní syndrom, intermediární syndrom (IMS), opožděnou polyneuropatii indukovanou OP (OPIDP) a chronickou neuropsychickou poruchu indukovanou OP (COPIND). Rozvinutí cholinergního syndromu je spojeno především s akutní toxicitou OP a jeho příznaky souvisejí se sníženou hladinou AChE. Mezi hlavní příznaky toho syndromu řadíme především: nadměrné pocení, rhinitidu, zvýšenou lakrimaci a salivaci, křeče v břiše, respirační potíže, bradykardii, nechutenství, zvracení, průjem a samovolný únik moče a stolice. Tyto symptomy mohou vyústit až v záchvaty a silné křeče, které vedou k respiračnímu selhání. Při přežití prvních dnů po expozici, dochází u pacientů ke změnám v chování. Zejména pak k rychlým změnám nálady, schizofrenickým reakcím a paranoidním bludům (Jokanović, 2018).

Intermediární syndrom je poškozením, které se vyskytuje zejména v intervalu mezi cholinergním syndromem a OPIDP. Po vystavení organismu různým OP pesticidům se klinické projevy IMS projevují během 24–96 hodin. Intermediární syndrom je znám jako porucha neuromuskulárního spojení, avšak přesná etiologie a rizikové faktory nejsou detailněji objasněny. Tento syndrom se vyskytuje především u pacientů s déle inhibovanou AChE, avšak není to vždy pravidlem. Celý průběh je závislý na mnoha faktorech, mezi které řadíme: opožděný metabolismus OP pesticidů v důsledku snížené metabolické funkce některých orgánů; zvýšená hladina svalových enzymů a adekvátní oximovou terapii. Mezi rizikové pesticidy patří například fenthion, dimethoát a methylparathion (Obr. 3). Existují studie, které popisují souvislost, mezi rozvinutím IMS a zvýšenou hladinou kreatinfosfokinázy a laktátdehydrogenázy. Jedná se o enzymy, které jsou jakými si markery svalové činnosti. Při zvýšené expozici OP pesticidům, dochází ke zvýšení hladiny těchto enzymů v krvi. V závažných případech může docházet až k tvorbě nekrotických oblastí ve svalech. IMS pak ústí v abdukci a flexi kyčlí a výraznou slabost v ramenou (Jokanović, et al., 2010).



Obr. 3: Strukturní vzorce (a) fenthionu, (b) dimethoátu a (c) methylparathionu.

Třetí výše zmíněnou neurotoxickou poruchou je OPIDP. Jedná se o vzácnou formu toxicity způsobenou jen některými OP. Během této poruchy dochází k degradaci dlouhých axonů u neuronů v centrální i periferní nervové soustavě. Celý proces vede k ataxii a paralýze dýchacích svalů. Tato poškození se dostavují přibližně 2–3 týdny po expozici. O OPIDP se začali vědci zajímat zejména v roce 1930, kdy došlo k rozsáhlé kontaminaci nápojů a potravin v USA. Koncem 20. století se pak objevilo několik případů otrav v Itálii, Rumunsku, Číně a dalších zemích. Toto onemocnění je charakteristické svým projevem po jednorázové expozici OP. Mezi hlavní příznaky polyneuropatie patří: křečovitě bolesti a brnění dolních končetin, parestázie a celková svalová slabost, která se rychle šíří a pacienti se tak stávají nestabilní a nedokáží udržet rovnováhu (Jokanović, et al., 2011).

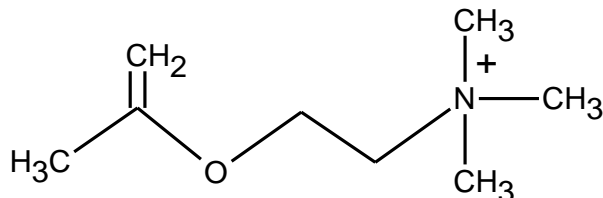
Chronická neuropsychická porucha indukovaná OP je závažným onemocněním, které se rozvíjí jak při akutních otravách OP, tak i při chronicky nízkých expozicích. Hlavními příznaky pak jsou: snížená schopnost soustředění se, snížená kapacita paměti, časté změny nálad, úzkost, deprese a chronická únava. Lze tedy říci, že COPIND a OPIDP jsou velice podobné neurotoxické poruchy, které jen s těžší od sebe odlišit (Tan, et al., 2009).

V současné době je schválena léčba podáváním atropinu, pralidoximu a oximů obecně. Problémem oximů je snížená průchodnost přes hematoencefalickou bariéru. Jednou z možností, jak zlepšit jejich prostupnost je zvýšení lipofility léčiv, avšak s tím je spojené i zvýšené riziko toxického účinku. Dalším předpokladem je využívat tzv. prekurzory, které podléhají oxidaci po průchodu hematoencefalickou bariérou.

Jejich oxidací dochází ke vzniku aktivních kvarterních oximů, které pak mohou působit jako léčiva a reaktivátory AChE (Katz, et al., 2018).

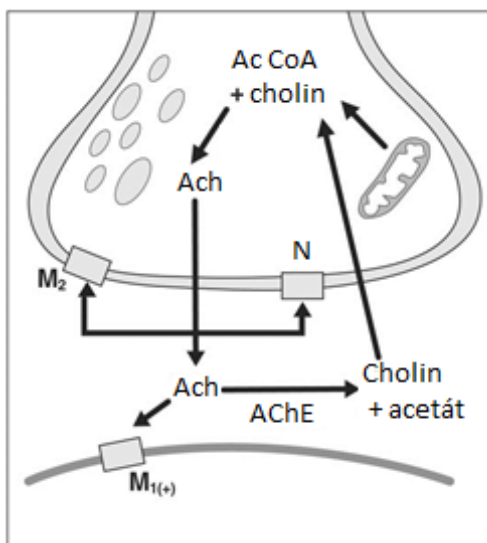
1.2 Neurotransmitery a ovlivnění jejich funkcí

Acetylcholin (Ach), (Obr. 4) je hlavní neurotransmitter v mozku, s výraznou aktivitou v kortexu, bazálních gangliích a předním mozku.



Obr. 4: Strukturní vzorec acetylcholinu.

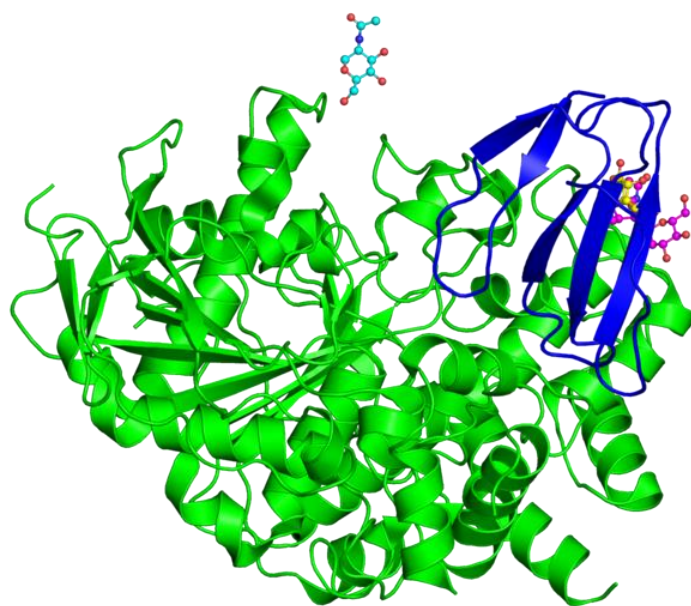
Významnými složkami pro tvorbu acetylcholinu jsou cholin a acetylkoenzym A (Ac CoA), Acetylkoenzym A vzniká rozpadem glukózy prostřednictvím glykolýzy (Krebsova cyklu). Společně s Ac CoA se syntetizuje také acetylcholinesteráza AChE. Jakmile je Ach uvolněn do synaptické štěrbině, váže se na postsynaptický receptor, čímž přenáší signál z jednoho neuronu na druhý (Obr. 5). Přebytek neurotransmiteru je následně rozložen enzymem AChE na cholin a acetát (Hampel, et al., 2018).



Obr. 5: Fyziologie cholinergní synapse (Hampel, et al., 2018).

Acetylcholinesteráza je monomerní enzym s 12 zapletenými centrálními β -listy, které jsou obklopeny 14 α -helix šroubovicemi. Lidská acetylcholinesteráza (hAChE) má elipsoidní tvar (Obr. 6). Nejvýznamnějším rysem struktury je hluboké a úzké hrdlo, dlouhé přibližně 20 Å, pronikající do poloviny enzymu (Ranjan, et al., 2018).

Aktivní část AChE se nachází 4 Å od spodní části molekuly a obsahuje dvě podjednotky: anionické a esterové místo, které zodpovídá za katalytickou aktivitu, především pak za vazbu acetylcholinu. Anionické místo váže pozitivně nabitý kvarterní amóniový kationt cholinu, stejně tak jako ostatní kvarterní ligandy kompetitivních inhibitorů a rovněž kvarterní oximy, které reaktivují inhibovanou AChE (Čolović, et al., 2013).



Obr. 6: 3D struktura hAChE, použité ligandy: α -L-fukóza, N-acetyl-G-glukosamin a 2-(acetylamino)-2-deoxy- α -D-glukopyranóza (PBD, 2001).

Při inhibici lidské AChE účinkem OPs, lze její reaktivace dosáhnout podáním silného nukleofilu. Jedná se především o deriváty pyridinaldoximu. Tyto oximy jsou však z pravidla nabitě sloučeniny, které neprocházejí snadno přes hematoencefalickou bariéru. Dochází tak k hromadění Ach v centrálním nervovém systému a narušení šíření nervového vzruchu (Leroy-Trovaslet, et al., 2011).

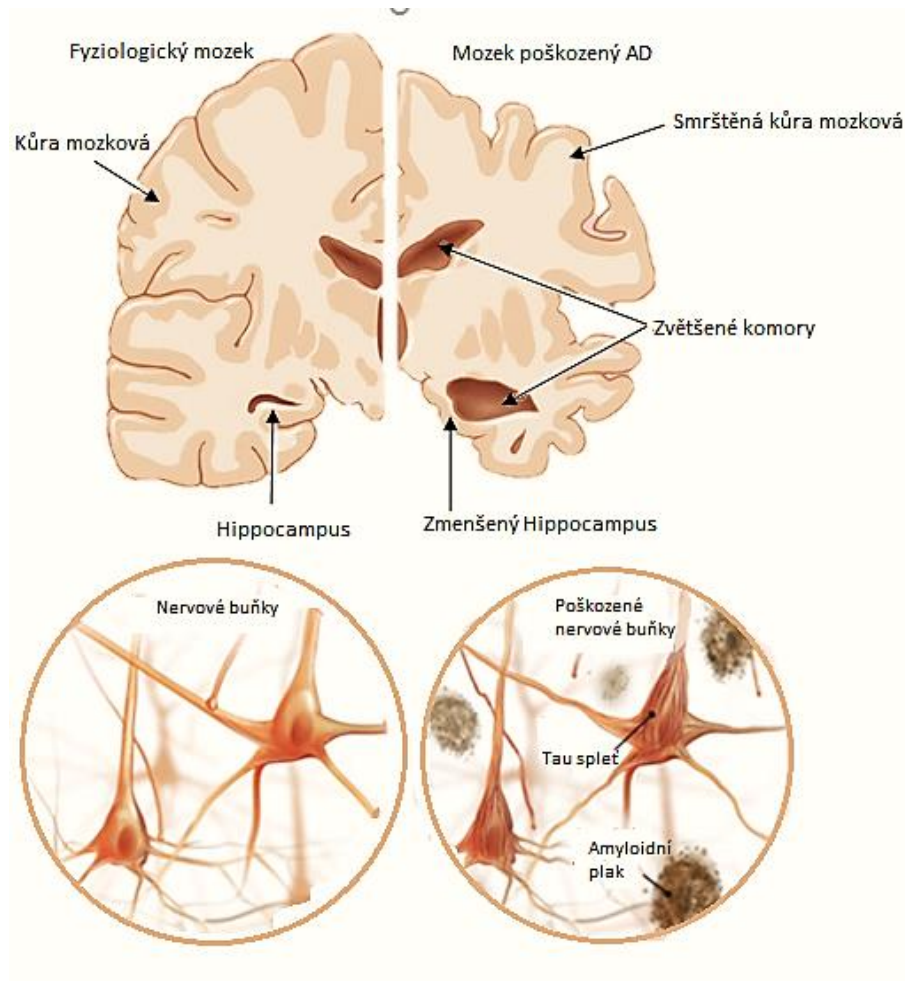
V současné době probíhá celá řada výzkumů, věnujících se léčbě toxicity OPs a jejich vlivu na AChE. Jednou z možností léčby, je podávání butyrylcholinesterázy (BChE). Jedná se o glykoprotein, který je syntetizován v játrech a následně vylučován do plazmy, slinivky, srdce, svalů, ledvin a mozku. BChE hydrolyzuje látky, které blokují neurotransmitery, jako je AChE (Inangil, et al., 2016). Lze tedy BChE označit za bioscavenger, který lidskou AChE chrání před toxicitou organofosfátů. Lidská BChE purifikovaná z plazmy nemá žádný výrazný nepříznivý efekt, je poměrně stabilní a vykazuje poločas rozpadu až jeden týden (Leroy-Trovaslet, et al., 2011).

1.2.1 Alzheimerova choroba (Alzheimer disease-AD)

Alzheimerova choroba je progresivní neurodegenerativní onemocnění vyskytující se většinou ve formě demence u starších osob (Association, 2010). Poprvé byla AD diagnostikována v roce 1906 německým psychiatrem Aloisem Alzheimerem. Zároveň byly popsány první příznaky, na základě, kterých vznikl název Alzheimerova choroba (Korabecny, et al., 2014). Mezi etiologické rysy AD patří: rozvinutý amyloidní plak na mozku s depozicí β -amyloidu, přítomnost neurofibrilárních klubek, tau proteinu a snížená hladina acetylcholinu (Piasecka-Markowicz, et al., 2018), (Obr. 7). Alzheimerova choroba se však může rozvíjet přibližně 20 let před projevem výše uvedených symptomů a v konečném důsledku způsobuje úmrtí postižených. Veškerá etiologie onemocnění souvisí s narušením struktury neuronů, které jsou zapojeny do schopnosti učení, myšlení a paměti (Association, 2010).

Doposud není zcela jasné, co je příčinou AD, avšak většina studií připisuje rozvinutí tohoto onemocnění vlivu genetické mutace a životního stylu populace. Velmi detailně je popsána tzv. β -amyloidní kaskádová teorie. Tato teorie předpokládá, že nadměrná produkce extracelulárního β -amyloidu vede k jeho agregaci, která způsobuje amyloidní plaky na mozku (Tan, et al., 2019).

Druhou významnou teorií je tau hypotéza, vycházející z fyziologie tau proteinu. Tau protein byl objeven před 40 lety jako protein spojený s mikrotubuly s významnou funkcí v nervové tkáni (Tan, et al., 2019). Gen tau proteinu je umístěn na dlouhém raménku chromozomu 17 a je tvořen 16 exony. Při sestřihu exonů 2, 3 a 10 dochází k možnému vzniku 6 kombinací případně k 6 možným izoformám tau proteinu, které se nacházejí v axonech neuronů (Jouanne, et al., 2017). Obecně je tento protein velice odolný proti vysokým teplotám a vyšším koncentracím kyselin. Vzhledem k tomu, že je tau protein schopen přecházet v různé konformace, nepodařilo se určit jeho strukturu krystalografickými metodami (Mukrasch, et al., 2009), nýbrž pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Schopnost tohoto proteinu vázat se na mikrotubuly podléhá fosforylaci serinu a threoninu, čímž je výrazně ovlivněna vazba tau na mikrotubuly. Fyziologický průběh fosforylace je významný zejména v období vývoje jedince. Nadměrná fosforylace tau proteinu může vyústit v neurodegeneraci, zejména u dospělých (Ballatore, et al., 2007).

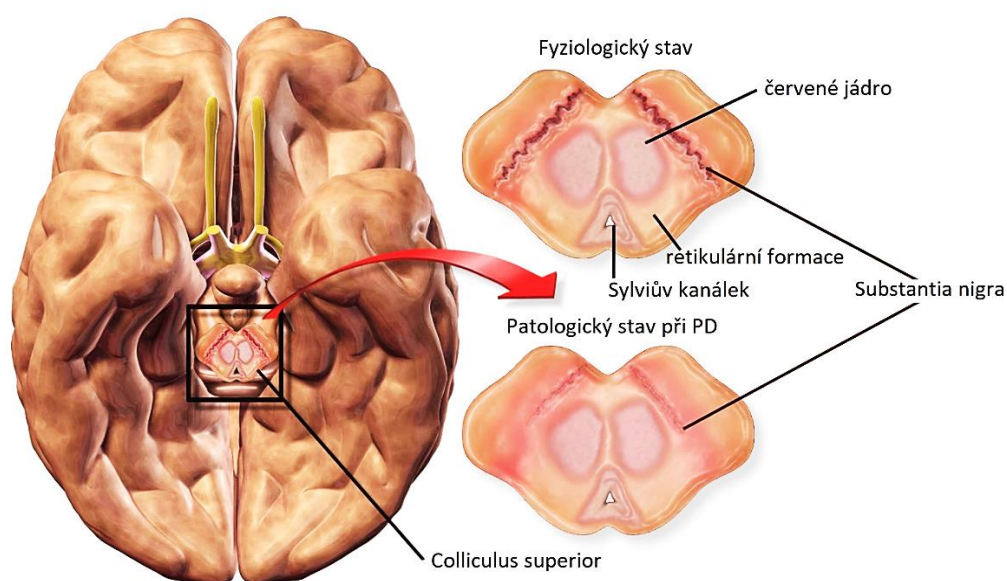


Obr. 7: Změny na mozku při Alzheimerově onemocnění (Jin, 2015).

V současné době je schválena pouze symptomatická léčba AD, pomocí inhibitorů AChE, jako jsou: donepezil, rivastigmin a galantamin. Problémem léčby AD je její rozmanitá patofyziologie, tudíž dosavadní vývoj léčiv nezaznamenal větší úspěch než potlačení některých kognitivních symptomů. Cílem moderních výzkumů je snížení tvorby amyloidních peptidů inhibicí enzymů β -sekretáz a γ -sekretáz. Potenciální léčiva AD jsou studována ve vztahu k energetickému metabolismu, mitochondriálním funkcím a produkci reaktivních forem kyslíku. Jedním z potenciálních léčiv AD je např. metformin. Jedná se o antidiabetikum, které snižuje hladinu glukózy a zároveň působí protizánětlivě, antiapoptoticky a zabraňuje rozvinutí oxidativního stresu (Piasecka-Markowicz, et al., 2018).

1.2.2 Parkinsonova choroba (Parkinson's disease-PD)

Jedná se o multifaktoriální neurodegenerativní onemocnění charakteristické narušením struktury či úplnou ztrátou specifických neuronů. Onemocnění následně ústí k dysfunkci centrální nervové soustavy (CNS) a poškození pohybového aparátu (Tan, et al., 2019). Při této nemoci je zasažena malá část mozku, tzv. *substantia nigra* (Obr. 8). Jakmile jsou postiženy buňky z této oblasti, dochází ke zvýšenému uvolňování dopaminu, který se podílí na kontrole pohybu. Čím nižší je hladina dopaminu, tím vyšší je pravděpodobnost postižení PD. Při takovýchto patologických stavech není mozek schopen vysílat nervové vzruchy správně, čímž může dojít k rozvinutí poruchy spánku, poškození paměti a depresím (An, et al., 2018). Kromě klasické formy PD, může být vyvolána sekundární forma, známa jako Idiopatická Parkinsonova choroba (IPS). Toto sekundární neurodegenerativní onemocnění se projevuje jako vedlejší účinek při vaskulární encefalopatii (vaskulární demence). Těžšími formami PD jsou pak Atypický Parkinsonův syndrom, Progresivní supranukleární obrna a Mnohočetná systémová atrofie. Tyto formy PD jsou charakteristické svým rychlým progresem, který však lze léčit podáváním dopaminu (Pereira, et al., 2019).



Obr. 8: *Substantia nigra (jádro v mezencefalu) s patrnou melaninovou pigmentací okolo dopaminergní dráhy (Wikiwand, 2013).*

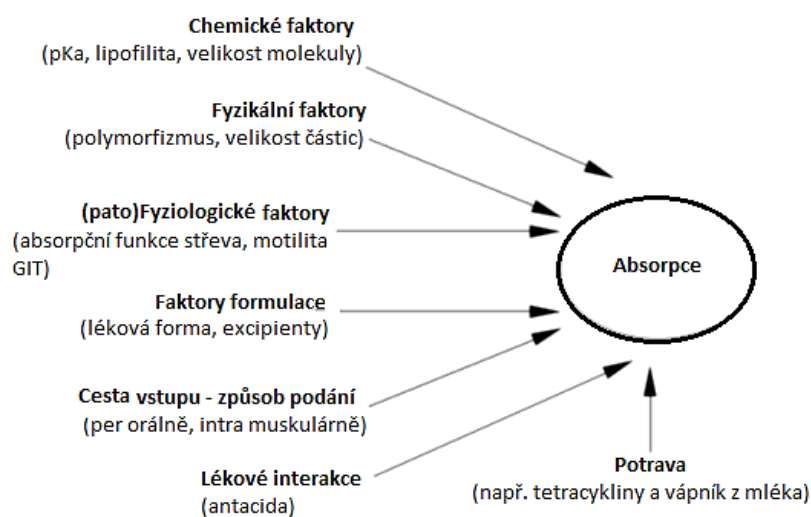
Doposud není známa přesná příčina tohoto onemocnění, avšak studie probíhající po smrti pacientů odhalily výrazný vliv oxidačního stresu a mitochondriální dysfunkce na Parkinsonovu chorobu. Dále pak celá řada studií popisuje zvýšené riziko onemocnění

při expozici organismu pesticidům. Nejprozkoumanějšími skupinami pesticidů potenciálně rozvíjejících PD jsou neurotoxické sloučeniny, mezi které řadíme: organofosfáty, karbamáty, organochlory aj. (Mostafalou, et al., 2013).

1.3 Farmakokinetika a farmakodynamika léčiv

Farmakokinetika je obor, který se zabývá studiem dějů, jež ovlivňují přítomnost léčiva v organismu v časovém úseku od podání až do jeho vyloučení z organismu. Základním předmětem farmakokinetiky je vztah mezi dávkováním a koncentrací léčiva v daných časových intervalech. Důvodem této studie je popsat reakci organismu na podané léčivo, respektive vysvětlit nástup, intenzitu a trvání terapeutických nebo toxických účinků podaného léčiva. Mezi základní farmakokinetické procesy patří: absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece (Švihovec, et al., 2018).

Absorpce léčiv a jiných xenobiotik je proces, při kterém látky pronikají z místa podání do krevní systémové cirkulace. Mezi hlavní rysy tohoto procesu patří rychlost a rozsah. Rychlost absorpce léčiva udává především nástup jeho účinku, kdežto rozsah absorpce udává dobu trvání terapeutického účinku. Existuje celá řada faktorů, které ovlivňují absorpci léčiv. Pro zjednodušení přehledu těchto faktorů je uveden Obr. 9 (Yang, et al., 2016).

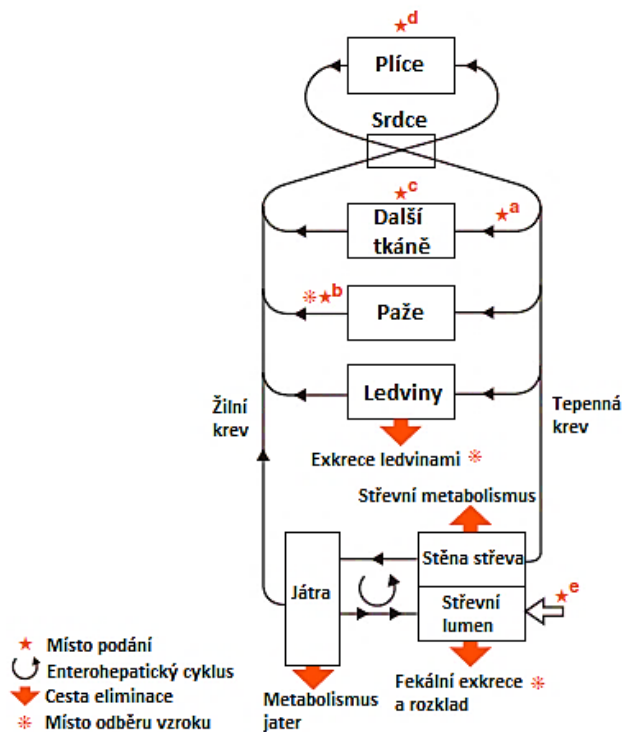


Obr. 9: Faktory ovlivňující absorpci.

Distribuce léků spočívá v jejich obousměrném transportu z krve do tkání a zpět. Míra distribuce vychází z fyzikálně-chemických vlastností léčiva a schopnosti překonávat biologické membrány. Zároveň je důležitým faktorem rychlost krevního

zásobení jednotlivých orgánů v různých částech organismu. Rozsah distribuce xenobiotik se zjišťuje především analýzou koncentrace léčiva v krevní plazmě a vypočítáním zdánlivého distribučního objemu. Tento parametr vychází z poměru množství léčiva v organismu a jeho koncentrace v plazmě (Dong, et al., 2019).

Eliminační děje souvisí s metabolismem a exkrečními mechanismy xenobiotik. Ve většině případů dochází k přeměně léčiva po distribuci do krevního řečiště, tkání a orgánů, jako jsou játra, gastrointestinální trakt, ledviny, plíce a mozek (Obr. 10). Léčivo se tak dostává do styku s biotransformačními enzymy, čímž dochází k jejich chemické přeměně. Celý metabolismus ústí k převedení původního léčiva na jednodušší a polárnější molekuly, které jsou z organismu snadno eliminovány. Popřípadě dochází k biotransformaci léčiva na metabolit, který zajišťuje jeho terapeutický účinek (Chillistone, et al., 2017). Hlavními orgány zajišťujícími exkreci xenobiotik jsou ledviny a játra. Ledviny jsou exkrečním orgánem zejména pro látky rozpustné ve vodě a látky velmi polární. Jedná se především o rozpustné metabolity lipofilních léčiv. Procesy, kterými jsou tyto metabolity vylučovány, nazýváme glomerulární filtrace a aktivní tubulární sekrece. Stejně tak játra převádí do žluče polární látky, které poté ústí do střev a následně jsou vyloučeny z organismu (Wilkinson, et al., 2008).



Obr. 10: Možná místa vstupu a výstupu z/do organismu (Tozer, et al., 2016).

Farmakokinetika se tedy zaměřuje na pohyb léčiva tělem, kdežto farmakodynamika se zabývá účinkem vyvolaným tímto lékem (Visser, 2018). Z čehož vychází vztah mezi koncentrací léčiva a odezvou na léčivo (Corrie, et al., 2017). Pro farmakoterapeutickou praxi je důležité, že farmakodynamika hodnotí účinky léčiv z kvantitativního hlediska. Nástup účinku, jeho intenzita a doba trvání jsou posuzovány ve vztahu k dávkování a cestě podání léčiva (Švihovec, et al., 2018). Mezi léky s podobnými nebo opačnými farmakologickými účinky, se mohou objevovat tzv. farmakodynamické interakce. Přičemž tyto interakce lze rozdělit do tří hlavních skupin: interakce, které probíhají na jediném receptorovém místě; interakce, které se vyskytují na různých receptorových místech a obecně nespecifické interakce zprostředkované nespecifickými místy působení. Tyto interakce léčiv jsou v rámci farmakodynamiky neomezené, proto lze jen s těží zmínit všechny farmakodynamické interakce (Corrie, et al., 2017).

Vývoj nových léků se významně opírá o získávání farmakokinetických znalostí nové lékové entity. Tyto informace pak slouží jako zpětná vazba vědeckým pracovníkům pro případnou úpravu léčiva tak, aby bylo dosaženo optimálního vztahu mezi strukturou, aktivitou a transportem léčiva do cílového místa organismu (Tozer, et al., 2016).

Mezi nejběžnější biologické cíle léčiv řadíme receptory (membránové a intracelulární), iontové kanály, transportní proteiny, enzymy a neproteinové struktury (nukleové kyseliny). Správná interakce léčiva s aktivním místem cílového prekursoru hraje zásadní roli při procesu objevování nových léčiv, identifikaci případných produktů vznikajících po zániku vazby mezi léčivem a biologickým cílem, popřípadě při identifikaci pozitivního či negativního vlivu léčiva na biologický cíl (Švihovec, et al., 2018). Rozlišujeme tak dvě hlavní skupiny léků. První druhy léků jsou známy jako kompetitivní inhibitory, které se vážou na aktivní místo cílové molekuly. Dochází tak k soutěži inhibitorů s molekulami substrátu o vazebné místo na enzymu. Druhý typ léků, označovaný jako alosterické inhibitory, se váže na alosterické místo cíle. Tato interakce mění tvar a strukturu metabolicky významných komponent, což může vést k metabolické nerovnováze (Sachdev, et al., 2019).

Jak již bylo zmíněno, farmakologické a toxikologické účinky mnoha léčiv se vyskytují na intracelulární úrovni. Proto je velmi důležité chápat princip distribuce

léčiva do těchto míst. Každá buněčná organela představuje fyziologicky jedinečný prostor (např. povrch, objem, pH, membránový potenciál a membránové složení), který se může lišit napříč různými typy buněk. Spolu s fyzikálně-chemickými vlastnostmi molekul léčiv tyto vlastnosti určují rychlost a rozsah, v jakém se léky distribuují do intracelulárních míst působení. I když jsou tyto pochody velmi často přehlíženy, mohou mít velký význam pro návrh vhodného léčiva (Scott, et al., 2017).

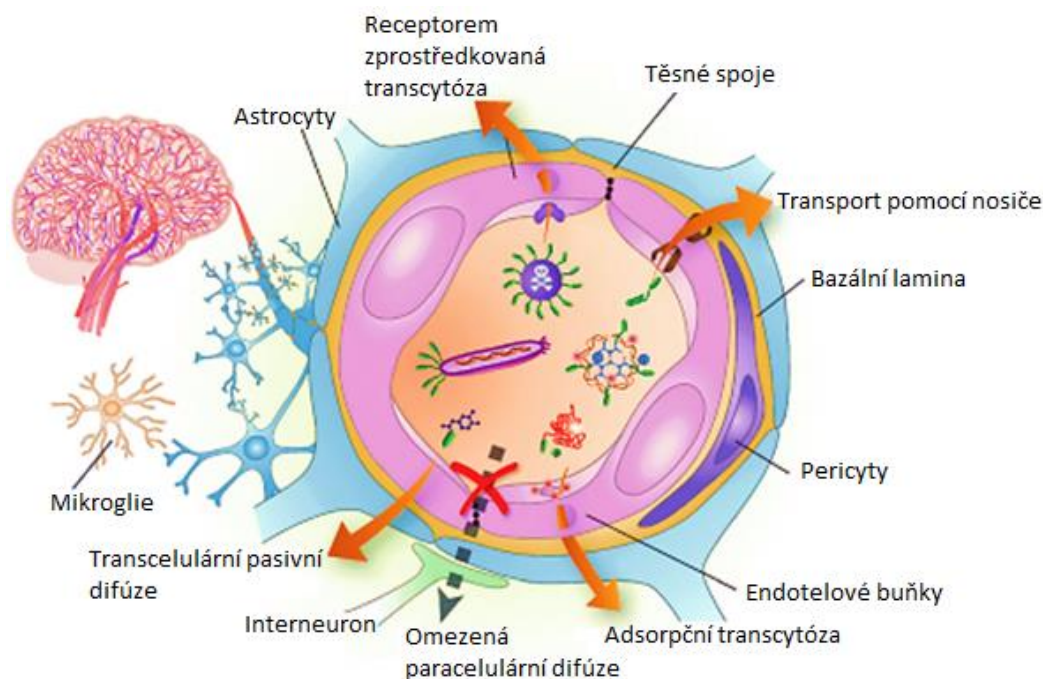
Všechny buněčné membrány jsou tvořeny fosfolipidovou dvojvrstvou, která obsahuje velké množství glykoproteinů. Buněčné membrány jsou tedy dobře propustné pro látky rozpustné v tucích, a naopak nepropustné pro látky hydrofilní. K prostupu léků přes membrány dochází jednou ze čtyř metod: difúzí, filtrací, transportem v přítomnosti vhodného nosiče, popřípadě pinocytózou (Chillistone, et al., 2017).

Difúzi molekul rozdělujeme na základě jejího průběhu, a tedy na prostou a usnadněnou. Při prosté difúzi dochází k pohybu molekul z místa s vyšší koncentrací do místa s nižší koncentrací, ve směru chemického gradientu. Tento princip prostupu membrán je nejvýznamnější zejména pro lipofilní molekuly, prostupující lipofilní dvojvrstvu. Celý proces probíhá bez přítomnosti energie. Jedná se o metodu, která probíhá spontánně, až do ustálení koncentrace léčiva na obou stranách membrány. Míra prostupnosti léčiva membránou je ovlivněna také schopností přijímat či odevzdávat vodíkový kation. Tento děj vychází z hodnoty pH prostředí (Zhou, et al., 2016). Usnadněná difúze probíhá na stejném principu jako volná difúze, avšak v tomto případě zajišťuje přechod molekul přítomnost membránových přenašečů nebo transport iontovými kanály (Sachdev, et al., 2019).

Druhou významnou metodou průchodu molekul membránami, je filtrace. Během tohoto děje dochází k pohybu léčiva mezibuněčnými spoji a póry (př. glomerulární filtrace). Membránový přenos molekul však může být také zajištěn aktivním nosičovým transportem, popřípadě vezikulárním transportem (Katzung, 2017). Aktivní nosičový transport vede z místa o vyšší koncentraci do místa s koncentrací nižší. Jedná se tak o pohyb proti směru chemického gradientu, ke kterému je zapotřebí určité množství energie. Vezikulární transport je specifický svou variabilitou, a tedy jedná se o transport, který může probíhat v i proti směru koncentračního gradientu (Tozer, et al., 2016).

1.3.1 Prostupnost hematoencefalické bariéry pro reaktivátory AChE

Hematoencefalická bariéra (blood-brain barrier-BBB) je životně důležitá ochranná matrice složená z endotelových buněk, které filtrují krev a její složky přecházející z CNS do mozku. Složitá struktura BBB ztěžuje průchod látkám s primárním účinkem v CNS. Tato bariéra zajišťuje průchod výživy mozku a následnou exkreci metabolického odpadu zpět do krevního oběhu. Svou ochrannou funkci zajišťuje zejména těsnými spoji mezi endotelovými buňkami (Pajouhesh, et al., 2005). Těsné spojení má tendenci omezovat paracelulární tok hydrofilních molekul napříč BBB (Ballabh, et al., 2004). Naproti tomu malé lipofilní molekuly, jako je O_2 a CO_2 , difundují volně přes plazmatickou membránu. Avšak živiny včetně glukózy a aminokyselin pronikají do mozku přes transportéry (Obr. 11), (Huber, et al., 2001).



Obr. 11: Struktura hematoencefalické bariéry (Oller-Salvia, et al., 2016).

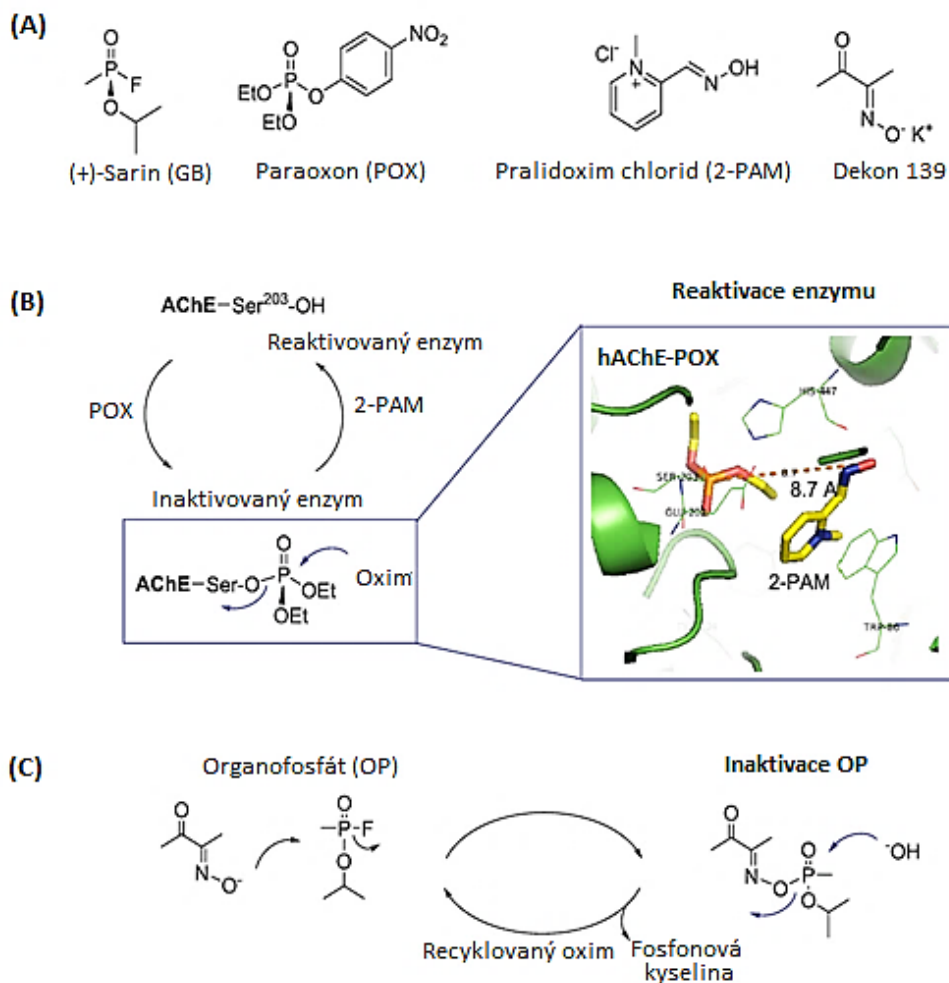
Jak je již výše uvedeno, je velice obtížné překonat BBB léčivem a zajistit tak jejich terapeutický účinek v CNS. Mezi terapeutika s primárním účinkem v CNS řadíme například reaktivátory AChE. Při syntéze nových léčiv lze předpovědět jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a zajistit tak správnou míru lipofility, aby léčivo dosáhlo svého primárního účinku v CNS. Optimem lipofility, tedy hodnota $\log P$ pro průnik

terapeutika BBB je v rozmezí 1,5–2,7 (Žďárová Karasová, et al., 2014). Obecně jsou totiž reaktivátory AChE vysoce hydrofilní molekuly v důsledku přítomnosti kvarterní struktury a hydrofilní oximové skupiny. Proto je jejich prostupnost BBB velmi omezena (Žďárová Karasová, et al., 2010).

Dalším velice významným kritériem pro predikci potenciálního průchodu xenobiotika přes BBB, je molekulová hmotnost. Při léčbě onemocnění souvisejících s CNS mají tato léčiva nižší molekulovou hmotnost, než léčiva působící na periférii nervové soustavy (Fischer, et al., 1998). Podle výzkumu Leeson a Davise (2004) mají centrálně aktivní látky střední hodnotu molekulové hmotnosti okolo 310 Da. Přičemž bis kvartérní oximy jsou pod hranicí této hodnoty, proto by měly být schopny částečně prostupovat BBB (Žďárová Karasová, et al., 2014).

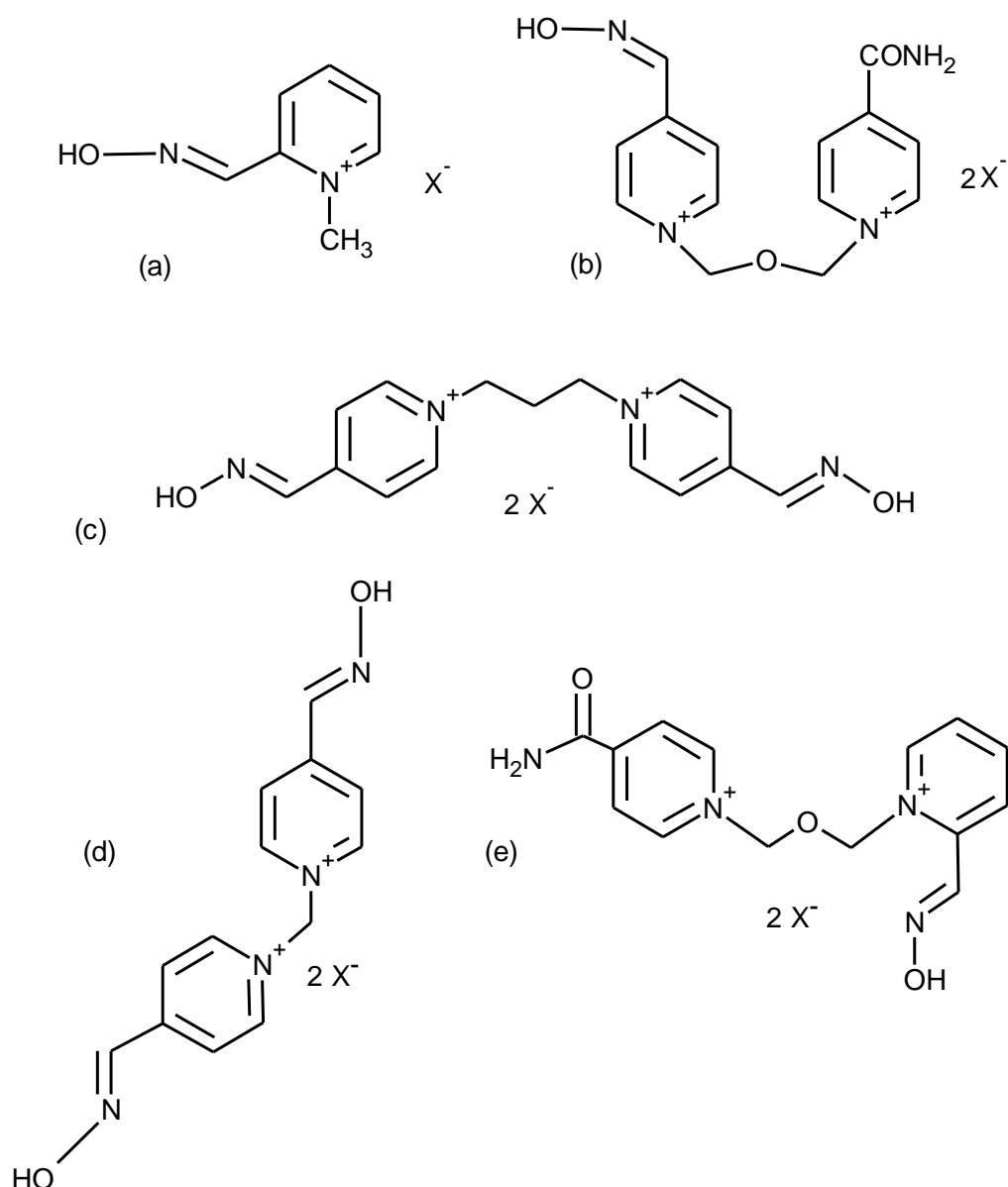
Reaktivátory AChE, známé také jako oximy, jsou stále rozvíjející se skupinou potenciálních léčiv při zasažení organismu nervově paralytickými látkami, pesticidy či jinými organofosfáty. V současné době se v klinické praxi pro léčbu OP toxicity využívají antimuskarinové (atropinové), oximové a antikonvulzivní (diazepamové) léky. Atropin a diazepam jsou v případě otravy OP využívány pouze pro potlačení symptomů. Oximy jsou naopak schopny reaktivovat komplexy AChE–OP, čímž obnovují fyziologickou funkci AChE (Žďárová Karasová, et al., 2017). Nukleofilní oximy mohou obnovit enzymovou funkci eliminací fosforylované skupiny z aktivního místa (Obr. 12), (Horn, et al., 2018).

Tyto oximy jsou si velmi podobné svou základní strukturou, ale liší se počtem pyridinových kruhů (mono pyridinové a bis pyridinové oximy). Dále je rozlišujeme dle polohy oximové skupiny na pyridinovém skeletu, a také podle řetězce mezi jednotlivými pyridiny (Žďárová Karasová, et al., 2010). Tyto základní strukturní vlastnosti určují nejen reaktivační účinnost oximů, ale také ovlivňují jejich toxicitu (Muckova, et al., 2019).



Obr. 12: (A) Struktury reaktivních organofosfátů, jako jsou (+)-sarin, POX a terapeutika na bázi oximů. (B) Mechanismus reaktivace enzymu v přítomnosti oximu. (C) Mechanismus katalytické inaktivace OP Dekonem 139 (Tang, et al., 2019).

Pro klinickou praxi hrají největší význam pralidoxim a obidoxim, společně s asoximem (HI-6), trimedoximem a methoximem (Obr. 13), (Žďárová Karasová, et al., 2010). Jejich využití je však stále ještě značně omezeno, kvůli nedostatečnému účinku vůči některým OP (Worek, et al., 2013).



Obr. 13: Strukturální vzorce (a) Pralidoximu, (b) Obidoximu, (c) Trimedoximu, (d) Methoximu, (e) HI-6.

Současné reaktivátory nedokážou reaktivovat záporně nabitě adukty, které jsou výsledkem spontánní dealkylace komplexu AChE–OP. Dalším problémem je kladný náboj pyridinových oximů, kvůli kterému nemohou reaktivátory procházet přes hemoencefalickou bariéru, čímž je ovlivněna reaktivace AChE v centrálním nervovém systému (Horn, et al., 2018). Pro zvýšení antidotního účinku bylo vyvinuto široké spektrum reaktivátorů. Mezi mono kvarterní oximy je řazen klinicky významný pralidoxim. Kdežto obidoxim, trimedoxim, methoxim a HI-6 spadají do skupiny bis kvarterních oximů. Tyto sloučeniny svou specifickou strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi napomáhají širokospektrálnímu antidotnímu účinku vůči sarinu, somanu a VX (Žďárová Karasová, et al., 2017).

Z historického hlediska, byl pralidoxim první a zároveň nejvyužívanější reaktivátor AChE. Nicméně, účinky pralidoximu při inhibici AChE tabunem, cyklosarinem, somanem nebo pesticidem, nebyly dostačující. To byl pravděpodobně důvod, proč byl pralidoxim nahrazen methoximem. Na základě několika studií lze říci, že reaktivátory jako obidoxim a trimedoxim, lze zařadit mezi velice slibné reaktivátory. Avšak jejich schopnost reaktivace AChE při zasažení organismu cyklosarinem a somanem je nevalná. Jako další významný oxim lze uvést methoxim, který se zdá být velmi účinný vůči cyklosarinu, sarinu a VX, avšak schopnost reaktivace při otravě tabunem, somanem a pesticidy je opět velmi nízká. Jeden s nejlepších reaktivátorů AChE je HI-6. Jedná se o oxim, který je schopen reaktivace při otravě téměř všech výše uvedených nervově paralytických látek, kromě tabunu. Existují však další oximy, s lepší reaktivací schopností, nežli HI-6. V tomto případě pak hovoříme o oximech K048, K027 a K203. Problémem však je, že preklinické a klinické výzkumy oximů jsou velice drahé a finální výsledky nejsou dostačující. Proto je stále obtížné najít vhodný univerzální oxim (Bajgar, 2012).

1.3.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti a farmakologické parametry vybraných oximů

Oximy jsou sloučeniny s velmi nízkým lipofilním charakterem. V důsledku toho je jejich trávicí absorpce a biologická dostupnost velmi nízká. Distribuce oximů je zajištěna zejména plazmatickým transportem a jejich penetrace BBB je velmi slabá (Bodor, et al., 1976). Tato snížená prostupnost souvisí zejména s jejich strukturou a hydrofilní oximovou skupinou. Eliminace oximů vychází z jejich polárního charakteru, a tedy prioritním eliminačním orgánem oximů jsou ledviny, ze kterých oximy a jejich metabolity následně přechází do moče. Přičemž hlavními eliminačními mechanismy oximů jsou glomerulární filtrace a aktivní tubulární sekrece (Georgiadis, et al., 2018), (Žďárová Karasová, et al., 2012).

Oximy lze považovat za slabé kyseliny, částečně ionizované při fyziologickém pH. Ionizovaný stav (charakteristický pro kvarterní amoniou strukturu) vysvětluje jejich nukleofilní vlastnosti. Oximy jsou pak dále charakteristické nitrosoximálním tautomerismem, který zajišťuje tvorbu méně hydrofilních forem oximů (Castro, et al., 2002).

První experimentální testy oximů, jako jsou diacetylmonooxim nebo monoisonitrosoaceton prokázaly neúčinnost těchto sloučenin, obsahujících terciární strukturu, především pak jejich nedostatečnou účinnost při reaktivaci AChE inhibované vysoce toxickými sloučeninami, jako jsou sarin, soman, tabun a VX. Obecně je známo, že při léčbě intoxikace těmito nervově paralytickými látkami, je využíván atropin společně s reaktivátory cholinesterázy potencující antidotní účinek s ohledem na podávané sloučeniny. Atropin pak blokuje centrální a periferní muskarinové cholinergní účinky nadbytku acetylcholinu. A reaktivátory cholinesterázy obnovují tkáňovou aktivitu AChE (Voicu, et al., 2010).

Při vyvíjení nové série oximů je důležité se zaměřit nejen na interakci mezi oximem a katalytickým místem na spodní straně AChE, ale také na možnou periferní vazbu pomocné funkční skupiny (Kim, et al., 2018). Za posledních několik desetiletí byly vyvinuty teorie, které napomáhají přípravě vhodných reaktivátorů, jež by usnadnily průnik BBB. Jednou z možností je zvýšení lipofility těchto oximů, avšak tím dochází ke ztrátě jejich náboje. Absence náboje způsobuje sníženou reaktivaci, protože nenabitě reaktivátory se řádně nevážou na aromtické vazebné místo spodní části AChE. Vedle centrálního vazebného místa AChE se nachází již zmíněné periferní vazebné místo (P-místo), které slouží pro vazbu specifických substrátů. Na základě této teorie byly vyvíjeny oximy, se specifickou vazbou na dvou místech, což vedlo ke zvýšené afinitě reaktivátorů k AChE (Wei, et al., 2014). Významnou skupinou jsou takrin–pyridinové hybridy, u kterých takrinový zbytek zajišťuje interakci s periferním vazebným místem AChE, což tak napomáhá její reaktivaci (Kim, et al., 2018).

Před zařazením nově syntetizovaných oximů, jako reaktivátorů AChE, do preklinické studie, je velmi důležité stanovit jejich fyzikálně-chemické parametry. Mezi jedny z nejdůležitějších parametrů řadíme disociační konstantu (pKa), lipofilitu (log P), polární částí molekuly (polar surface area, PSA) a donor vodíkové a akceptorové vazby (Sharma, et al., 2016).

Stanovení disociační konstanty souvisí se schopností daného oximu disociovat při nukleofilní reakci s enzymem v prostřední pH lidského organismu (pH = 7,4). Dochází tak ke vzniku nabitě mono kvarterní či bis kvarterní molekuly reaktivátoru, jejíž náboj omezuje průběh pasivní difúze přes biologické membrány. Tyto reaktivátory jsou nejčastěji podávány intramuskulárně a intravenózně. Pro použití oximu jako léčiva

pro lidský organismus je tedy velmi omezené rozmezí pKa těchto molekul. Podle několika studií je toto rozmezí stanoveno hodnotami 7,5–10,5. Disociační konstanta oximů v tomto rozmezí zajišťuje jejich dostatečnou prostupnost hematoencefalickou bariérou (Musil, et al., 2016).

Polární části molekul oximů definují počet polárních atomů (dusíků a kyslíků), ke kterým je ve struktuře oximů připojen vodík. Jedná se o velice významný parametr pro predikci vlastností transportu oximu. Donor vodíkové vazby (představující počet -OH a -NH skupin) a akceptorové vazby (představují počet dusíků a kyslíků) rovněž hrají klíčovou roli v predikci distribuce molekul oximů přes BBB (Sharma, et al., 2016). Parametry předpokládající dostatečnou penetrační schopnost oximů biologickými membránami popisuje tabulka 1.

Tab. 1: Parametry předpokládající dostatečnou penetraci oximů biologickými membránami:

Parametr	Hodnota
Molekulová hmotnost	<450 Da
PSA	60–70 Å
Počet otočných vazeb	<8
Počet donorů vodíkové vazby	3
Počet akceptorů vodíkových vazeb	<7

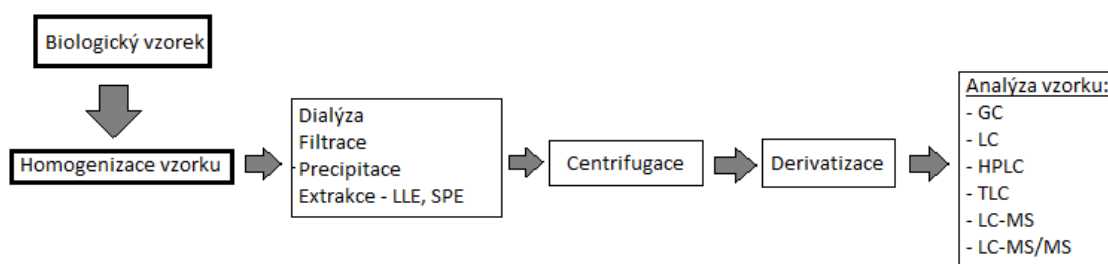
(Voicu, et al., 2010)

Stanovení farmakokinetiky nově syntetizovaných sloučenin je základním krokem před dalším (preklinickým) výzkumem. Maximální koncentrace po podání oximů, doba pro dosažení maximální (terapeutické) koncentrace oximů a jejich následná eliminační kinetika jsou jednoznačně rozhodujícími parametry, které zajišťují smysl následného preklinického a klinického výzkumu daného oximu. Jsou-li reaktivátory AChE aplikovány intramuskulárně, předpokládá se, že je tak celá dávka potenciálně dostupná pro systémovou absorpci, a tak tato cesta podání nabízí nejvyšší biologickou dostupnost. Oxim je nejdříve transportován plazmou do celého organismu s následnou eliminací do moče a ledvin. Přičemž pokles koncentrace oximu v plazmě koreluje se zvýšenou koncentrací tohoto oximu v moči a ledvinách (Žďárová Karasová, et al., 2012).

1.4 Odběr a úprava vzorků před vlastní analýzou

Správný odběr a úprava vzorku jsou nedílnou součástí každé chemické analýzy. Chyby způsobené zejména nesprávným odběrem vzorku mohou značně ovlivnit výsledky celého stanovení. Mezi nejčastější chyby odběru vzorku patří nepřesné odebrání celé populace vzorku, ze které je analyt odebírán. Pro předejití této chyby je důležité vždy odebírat vzorky pro analýzu z homogenního materiálu. Ve většině případů se však setkáváme s heterogenními materiály, jejichž složení se mění v závislosti na prostoru a čase a je tedy nutná jejich úprava (Harvey, 2000).

Mezi nejdůležitější kroky při úpravě vzorku před analýzou řadíme: centrifugaci, filtraci, precipitaci, extrakci, derivatizaci, odpařování a sušení, případně sonikaci a rozpouštění (Obr. 14). Každý vzorek je jedinečný, proto je nutné ke všem analýzám přistupovat individuálně a dodržovat všechny potřebné postupy jak pro odběr, tak pro následnou úpravu vzorku před analýzou (Choi, et al., 2005).



Obr. 14: Obecné schéma úpravy vzorku před vlastní analýzou.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit farmakokinetiku oximu K870 a jeho případných metabolitů u myši. Proces se skládal z řady kroků, jejichž konečným cílem bylo zavedení UPHLC-MS metody oximu K870, společně s extrakční metodou biologických vzorků z myši.

Dílčí cíle práce zahrnovaly:

- Vytvoření LC-MS metody pro stanovení oximu K870.
- Zpracování biologického materiálu (jaterní a ledvinná tkáň, plazma, moč, žluč) z myši.
- Aplikace LC-MS metody na zpracované biologické vzorky.
- Identifikace případných metabolitů oximu K870 v biologických vzorcích.

3 MATERIÁLY A METODY

3.1 Biologický materiál

3.1.1 Myší tkáňové vzorky

Analýza obsahu oximu K870 a jeho metabolitů byla provedena se vzorky z myší, kterým byl oxim podán per orálně. Následně byly jednotlivým myším odebírány vzorky v časových intervalech 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, a 240 minut. Mezi odebírané vzorky patří jaterní tkáň, ledvinná tkáň, moč, žluč a plazma. Vzorky byly získány ve spolupráci s Katedrou toxikologie a vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Uvedené biologické vzorky byly uskladněny při teplotě -80°C.

3.1.2 Lidské jaterní mikrozomy a cytosol

Lidské mikrozomální a cytosolické frakce byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Veškeré frakce byly uchovány při teplotě -80°C.

3.2 Chemikálie

Acetonitril pro LC/MS (Sigma-Aldrich, Německo)
Amoniak (Penta, Česká republika)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, Česká republika)
Glycerol (Penta, Česká republika)
Hydrogenfosforečnan didraselný (Penta, Česká republika)
Hydroxid draselný (Penta, Česká republika)
Chloroform (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina *o*-fosforečná (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina mravenčí 85% (Sigma-Aldrich, Německo)
Kyselina octová 99% (Penta, Česká republika)
Lidský jaterní cytosol (Sigma-Aldrich, Německo)
Methanol pro LC/MS (Sigma-Aldrich, Německo)
Lidské jaterní mikrosomy (Sigma-Aldrich, Německo)
Milli-Q Water (Merck, USA)
Mravenčan amonný pro LC/MS (Sigma-Aldrich, Německo)
NADPH-generační systém (Sigma-Aldrich, Německo)
Octan amonný pro LC/MS (Sigma-Aldrich, Německo)

Oxim K870 (připraveno na Katedře chemie, PřF UHK)

3.3 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Mettler Toledo, USA)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Stolní minicentrifuga (Benchmark my FugeTMMini)

Cary 60 UV-VIS spektrofotometr (Agilent Technologies, USA)

Centrifuga 5418 (Eppendorf, Německo)

Concentrator plus (Eppendorf, Německo)

Hlubokomrazicí box -86 °C (Thermo Scientific, USA)

Hmotnostní spektrometr 6470 Triple Quad (Agilent Technologies, USA)

Magnetická míchačka (Heidolph, Německo)

MiniSpin centrifuga (Eppendorf, Německo)

Multi Reax (Heidolph, Německo)

Multi-Vortex V-32 (Biosan, Lotyšsko)

pH-metr MultiLab 540 (WTW, Německo)

Předvážky (Mettler Toledo, USA)

Thermo-Shaker (Biosan, Lotyšsko)

UHPLC 1290 Infinity II (Agilent Technologies, USA)

Ultrazvuková vana (Polsonic, Polsko)

Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

Chromatografické kolony:

Kinetex C₈ 3 mm x 75 mm, 2,6 µm (Phenomenex, USA)

Kinetex PFP 3 mm x 75 mm, 2,6 µm (Phenomenex, USA)

Zorbax Eclipse Plus C₁₈ RR HD 2,1 mm x 50 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies, USA)

Zorbax Hilic Plus RR HD 2,1 mm x 50 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies, USA)

Zorbax SB-CN RR HD 2,1 mm x 50 mm, 1,8 µm (Agilent Technologies, USA)

3.4 Metody

3.4.1 Inkubace mikrozomálních a cytosolických frakcí s oximem K870

Inkubace oximu K870 s mikrozomálními a cytosolickými frakcemi probíhala při fyziologickém pH 7,4 a teplotě 37°C, po dobu 30 minut. Reakční směs o celkovém objemu 100 µl obsahovala 75 µl 10 mM K-fosfátového pufru (pH 7,4) s 20% glycerolem,

5 μl 20 μM mikrozomů/cytosolu a 10 μl NADPH-generačního systému. Poté byly všechny vzorky krátce stočeny na stolní mini centrifuze a vloženy do vyhřátého termobloku (37°C). Tímto byla odstartována 5 minutová preinkubace.

Následným přidáním 10 μl substrátu (oxim K870 v koncentracích, 1 μM , 5 μM , 50 μM , 250 μM a 500 μM) došlo ke spuštění enzymové reakce. Inkubace byla zastavena 200 μl směsí acetonitrilu s metanolem, v poměru 1:1 a zchlazením vzorků na 0°C. Kontrolní vzorky bez přidaného substrátu a neenzymové kontroly byly připraveny pro mikrozomální i cytosolické frakce.

Vzorky byly centrifugovány po dobu 10 minut při 15.000 x g a přefiltrovány přes stříkačkový filtr o porozitě 0,22 μm . Analýza možných metabolitů byla provedena metodou UHPLC se spektrofotometrickou (DAD: 275 nm, 298 nm) a hmotnostně spektrometrickou detekcí (scan v rozsahu hmot m/z 50 – 800).

3.4.2 Extrakce oximu K870 z biologických vzorků

Zhomogenizované vzorky jaterní a ledvinné tkáně, plazmy, moče a žluči, byly extrahovány metodou dle Folcha do metanolu s chloroformem a vodou (Folch, et al., 1957). Extrakční směs obsahovala 400 μl metanolu, 800 μl chloroformu, 250 μl 25 mM mravenčanu amonného a 10 μl vzorku (jednotlivé biologické vzorky odebírané v daných časových intervalech (viz 3.1.1)). Vzorky byly extrahovány na třepačce po dobu 10 minut a následně centrifugovány 5 minut při 15 000 x g. Z každého vzorku byla odebrána horní vodná fáze a převedena do nové zkumavky. Všechny vzorky byly odpařeny ve vakuovém koncentrátoru. Získané odparky byly rozpuštěny ve 100 μl Milli-Q vody a na dobu 10 minut vloženy do ultrazvukové lázně. Takto připravené vzorky byly převedeny do skleněných vialek opatřených insertem.

3.4.3 Chromatografická UHPLC-MS analýza biologických vzorků

Metoda pro stanovení metabolitů oximu K870 v biologických vzorcích byla vytvořena na přístroji UHPLC 1290 Infinity II s kolonou Zorbax Hilic Plus RRHD 2,1 mm x 50 mm, 1,8 μm a detektorem LC/MS 6470 QqQ. Měření probíhalo s mobilními fázemi A: 25 mM mravenčanem amonným (pH = 3,2) a B: 0,1% kyselinou mravenčí (formic acid-FA) v acetonitrilu (ACN). Gradient použitý během separace je uveden v tabulce 2.

Tab. 2: Gradient mobilních fází pro UHPLC-MS metodu při stanovení metabolitů oximu K870 v biologických vzorcích:

Čas [min]	Pumpa A [%]	Pumpa B [%]	Průtok [ml/min]
0	10	90	0,400
0,50	10	90	
7,00	70	30	
8,00	70	30	
8,10	10	90	
10,00	10	90	

Farmakokinetická analýza oximu K870 probíhala v tzv. Multiple reaction monitorig módu (MRM), kdy sledovanou látkou byla hmota 183 a její dominantní fragmenty 161, 54 a 175. Parametry zdroje: „*gas temperature 170°C, gas flow 8 l/min, nebulizer 30 psi, sheath gas temperature 400°C, sheath gas flow 12 l/min, capillary voltage 2500 V, nozzle voltage 0 V*“.

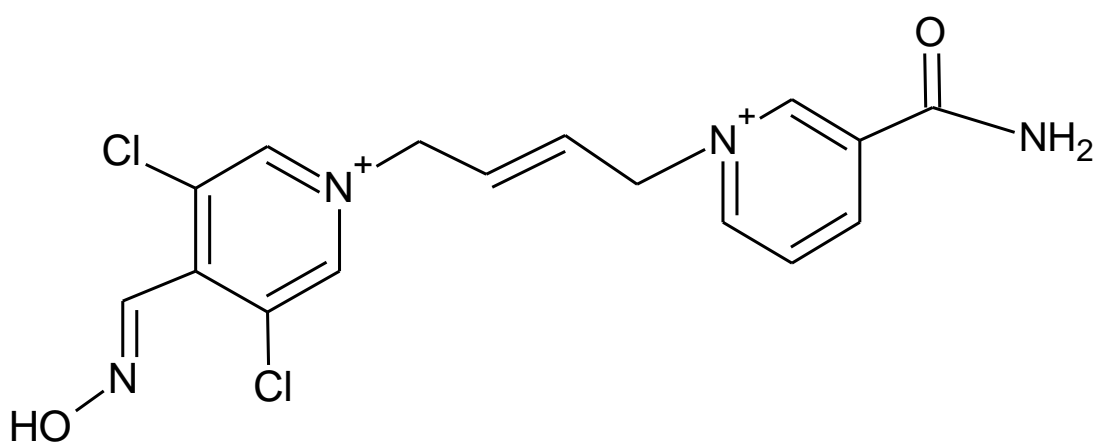
Farmakodynamická analýza oximu K870 a případných metabolitů probíhala v tzv. *full scanu*. Při měření se skenovaly hmoty v pozitivním módu, v rozsahu 100 – 1000 m/z. Následně probíhala analýza vybraných hmot, které se výrazně odlišovaly od negativní kontroly, tedy blanku. Tyto hmoty byly štěpeny při kolizních energiích 5, 15, 30 a 45 eV. Parametry zdroje byly totožné jako při farmakokinetické analýze oximu K870.

3.4.4 Spektrofotometrické stanovení nekalibrované čistoty oximu K870

Stanovení nekalibrované čistoty oximu K870 probíhalo na přístroji UHPLC 1290 Infinity II s kolonou Zorbax Hilic Plus RR HD 2,1 mm x 50 mm, 1,8 µm a detektorem diodového pole (DAD). Měření probíhalo s mobilními fázemi 25mM mravenčanem amonným (pH = 3,2) a 0,1% FA v ACN. Gradient mobilních fází je uveden v tabulce I. Analýza probíhala v rozmezí vlnových délek 190 – 400 nm.

4 Výsledky a diskuze

Oximy jakožto reaktivátory AChE jsou stále rozvíjející se skupinou potencionálních léčiv otravy nervově paralytickými látkami. Současné studie vedou k identifikaci nových antidot, případně doplňků ke standardní terapii při otravách organofosfáty. Od objevení pralidoximu v roce 1955, byly publikovány tisíce oximových struktur s vyšší terapeutickou účinností. Navzdory tomu, stále neexistuje univerzální oximová struktura s účinkem proti všem nervově paralytickým látkám (Worek, et al., 2016). Mnohé studie však potvrzují terapeutický přínos oximů ve spojení s atropinovou léčbou, proto se i tato práce zabývá oximem K870 (Obr. 15), jakožto potenciálním léčivem při otravách organofosfáty.

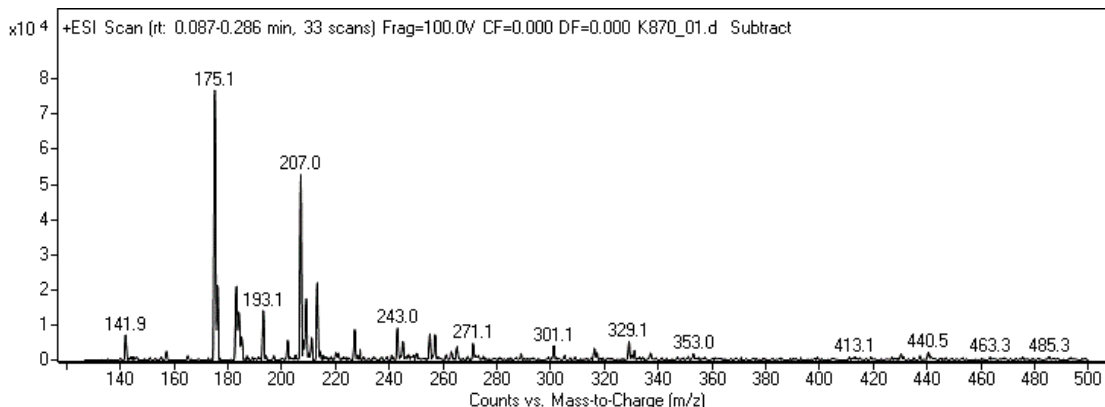


Obr. 15: Strukturální vzorec oximu K870.

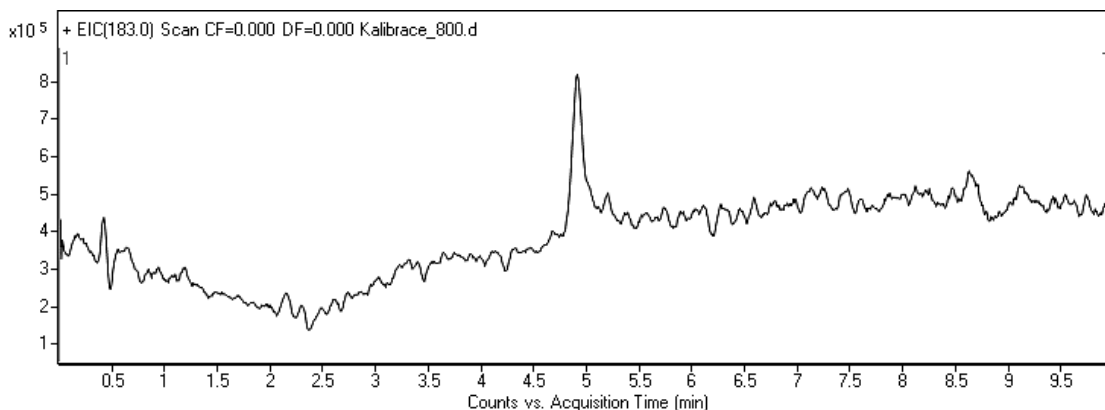
Před započítím měření oximu K870 v biologických vzorcích bylo nutné vytvořit přesnou LC-MS metodu. Protože využívaným detektorem byl trojitý kvadrupól (QqQ), bylo nutné jeho přesné nastavení, před samotnou analýzou. Pro tento účel, byly po přímém nástřiku oximu K870, sledovány jeho dominantní hmoty v celém rozsahu spektra. Z tohoto spektra bylo zřetelné, na které hodnoty se zaměřit, a dále podle nich správně nastavit detektor. Nastavení „multiple reaction monitoring“ (MRM přechodu), se využívá právě u trojitého kvadrupólu. Ekman, et al. (Ekman, et al., 2008) popisuje, že prvním kvadrupólem projde definovaná hmota m/z (tzv. prekurzorový iont), ta je rozštěpena v kolizní cele a třetím kvadrupólem opět projde definovaná hmota m/z (tzv. produktový iont) a ta je detekována.

Přímým nástřikem oximu K870 (Obr. 16) byly pozorovány dvě dominantní hmoty s $m/z = 175$ a $m/z = 183$. Hmota 183 odpovídala dvojitě nabitě molekule, tedy polovině molekulové hmotnosti oximu ($M_w = 366$ g/mol), (Thompson, 2017). Proto bylo nutné

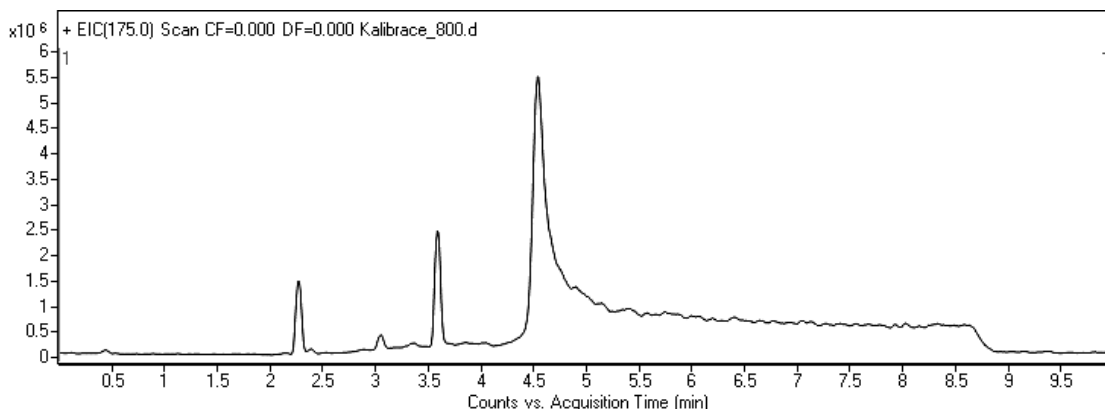
zjistit, jestli hmota 175 vzniká fragmentací z parentní látky ve zdroji nebo jestli se jedná o nečistotu.



Obr. 16: Hmotnostní spektrum z přímého nástřiku oximu K870 pro sledování jeho dominantních hmot.



Obr. 17: Chromatogram hmoty 183 po separaci na HILIC koloně.



Obr. 18: Chromatogram hmoty 175 po separaci na HILIC koloně.

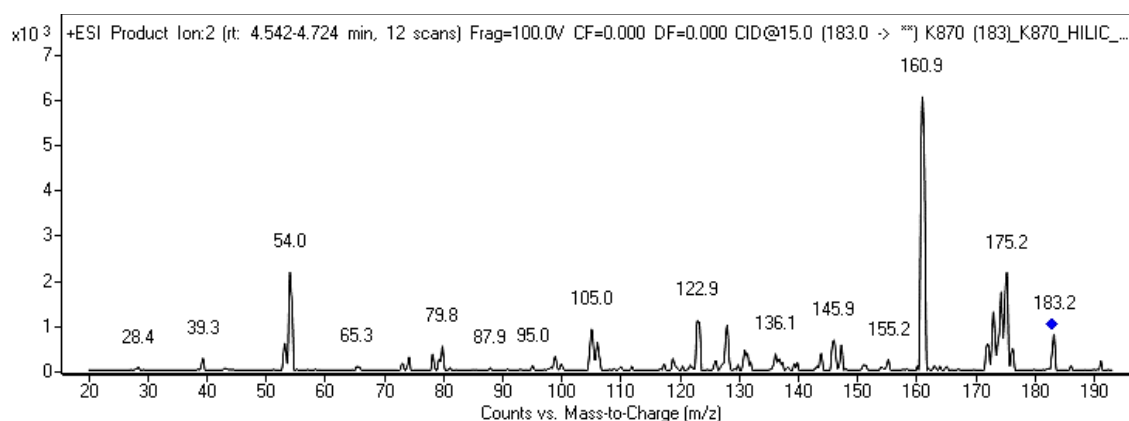
Po porovnání chromatogramů jednotlivých hmot (183 a 175) z HILIC kolony, bylo patrné, že má hmota 175 jiný retenční čas než parentní látka, lze tedy předpokládat, že se jedná o nečistoty vzniklé během syntézy nebo rozkladné produkty samotného oximu K870.

Cílem separace, bylo najít vhodnou chromatografickou kolonu, na které bude docházet k účinné eluci analyzovaných složek v prostřední vhodně zvolené mobilní fázi (MF). Pro tyto potřeby se prvotní analýza oximu K870 prováděla na kolonách C₈, C₁₈, Kyano koloně (CN kolona), Pentafluorofenyl propylové (PFP kolona) a Hydrofilní interakční koloně (HILIC kolona). Na všech zmíněných kolonách probíhala separace v prostřední pufrů mravenčanu amonného, octanu amonného, kyseliny mravenčí (FA), acetonitrilu (ACN), ACN s 0,1% FA, Milli-Q vody a Milli-Q vody s 0,1% FA.

4.1 Tvorba LC-MS metody

4.1.1 Nastavení MRM přechodů

Nastavení MRM přechodu vycházelo z přímého nástřiku oximu K870 s fragmentací parentní látky, tedy hmoty 183 (Obr. 19). Během této analýzy byly v hmotnostním spektru patrné dominantní hmoty, 175, 161 a 54. Hmoty 175 tak vznikala jednak fragmentací hmoty 183, a jednak jako produkt hydrolyzy, tedy nečistota s jiným elučním časem než parentní látka. Podle Ekman et al. (Ekman, et al., 2008), analýza s trojitým kvadrupólem jako detektorem, umožňuje nastavit první a třetí kvadrupól, jako filtry pro dané hmoty. První kvadrupól byl nastaven pro propouštění hmoty 183, kdežto třetím kvadrupólem procházely pouze dominantní fragmenty hmoty 183, a tedy $m/z = 175, 161$ a 54. Na kolizní celu mezi první a třetím kvadrupólem, byla vkládána kolizní energie 5, 15, 30 a 45 eV, pro rozpad hmoty 183. Hmoty 183, 175, 161 a 54 pak byly uloženy do vytvořené MRM metody, kterou byly analyzovány všechny biologické vzorky s cílem sledování $m/z = 183$ a jejich výše uvedených dominantních hmot.



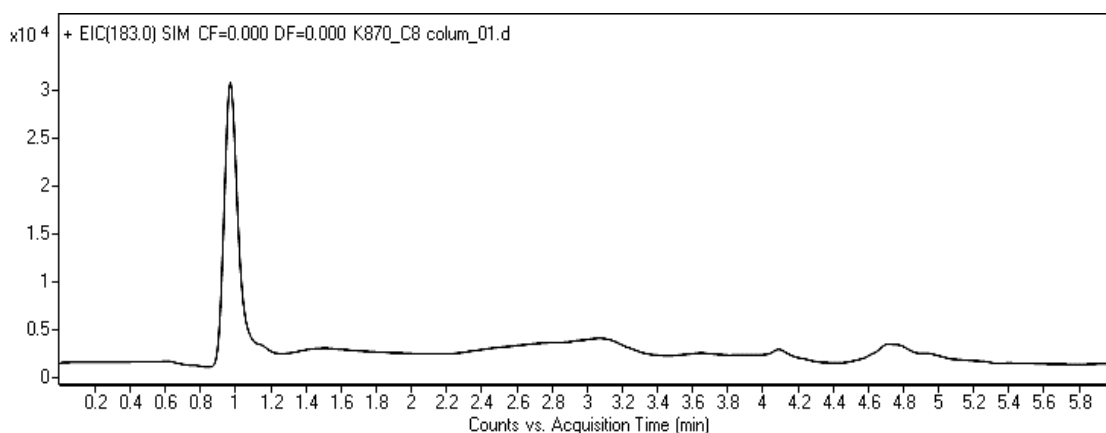
Obr. 19: Fragmentace parentní látky o $m/z = 183$.

4.1.2 Chromatografická analýza oximu K870 na C₈ a C₁₈ koloně

Během chromatografie na reverzních fázích je využíváno tzv. disperzních sil (hydrofobní nebo van der Waalsovy interakce). Polarity mobilních a stacionárních fází (SF) jsou obrácené, takže povrch SF je v tomto uspořádání hydrofobní, kdežto MF je polární. Tato technika je velice oblíbená pro separaci molekul s nízkou molekulovou hmotností. Jejím vysokým kreditem je schopnost rozlišovat velmi úzce příbuzné sloučeniny, a také jejich snadná variabilita retence a selektivity (Kazakevich, et al., 2007).

Mezi nejběžnější rozpouštědla MF patří metanol, voda a ACN, popřípadě jiná polární rozpouštědla. Při většině analýz se pak tato rozpouštědla využívají ve směsi s různým gradientem. Typ použitých stacionárních fází udává tzv. hydrofobnost kolony. Existují různé SF, které jsou tvořeny různě dlouhými uhlíkatými řetězci (C₄ – C₁₈). Tyto řetězce jsou chemicky vázané na nosiče, kterými jsou grafitové nebo uhlíkem potažené silikagely, kopolymery styrenu a divinylbenzenu (Kromidas, 2016).

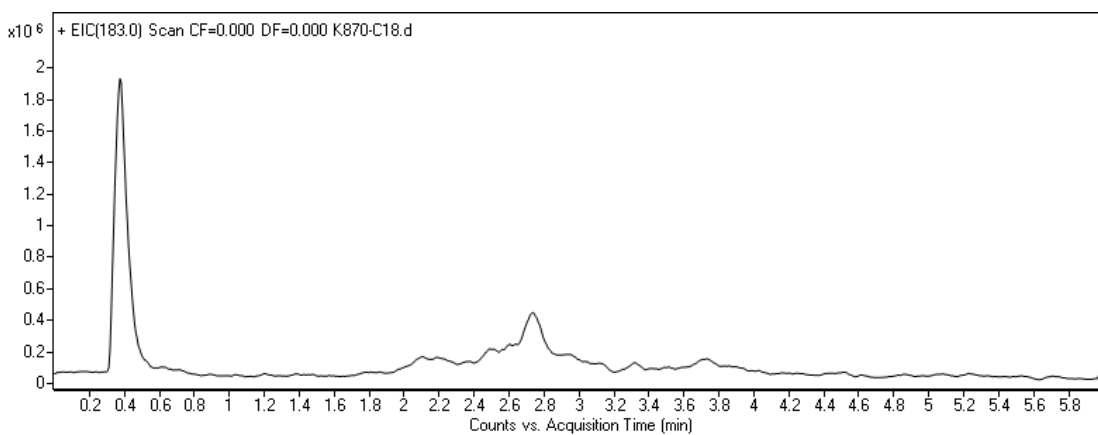
Během analýzy na koloně Kinetex C₈ 3 mm x 75 mm, 2,6 μm byla použita MF směs ACN s 0,1% FA a Milli-Q vody s 0,1% FA. Analýza probíhala s rostoucím gradientem pro ACN + 0,1% FA. Počáteční složení MF tedy bylo: 5 % ACN + 0,1% FA a 95 % Milli-Q vody + 0,1% FA. V 30 sekundových intervalech docházelo ke snižování obsahu Milli-Q vody s 0,1% FA a nárůstu ACN s 0,1% FA. Protože se jednalo o vysoce polární rozpouštědla, záznam oximu K870 byl patrný pouze na počátku analýzy, v retenčním čase 0,9 – 1,2 minut (min). Došlo tak k velmi rychlé eluci oximu z kolony, protože oxim K870 je bis kvarterní sloučenina s kvarterními dusíky, která neochotně vytváří vazbu s nepolární SF (Obr. 20). Vaznost polárních látek s nepolární SF ostatně popisuje Fanali et al. (Fanali, et al., 2013) a zároveň tak potvrzuje průběh této separace. Proto lze říci, že tato kolona není vhodná pro separaci polárních látek, jako jsou oximy a jemu podobné reaktivátory.



Obr. 20: Chromatogram oximu K870 analyzovaného v prostředí acetonitrilu a Milli-Q vody s 0,1% FA na C₈ koloně.

Další velmi využívanou kolonou při chromatografiích na reverzních fázích je C₁₈ kolona. Jedná se opět o kolonu s nepolární stacionární fází, která je vhodná především pro hydrofobní interakce. Pro analýzu oximu K870 byla konkrétně použita kolona Zorbax Eclipse Plus C₁₈ RR HD 2,1 mm x 50 mm, 1,8 μm. Předpokladem při měření na této koloně byla minimální retence analyzovaného oximu. Jedná se o sloučeninu, která obsahuje hydrofilní oxim, a proto není pravděpodobná interakce analytu se stacionární fází stejně jako v případě C₈ kolony (Fanali, et al., 2013).

Během měření bylo využito několik typů mobilních fází, a tedy acetonitrilu a Milli-Q vody s 0,1% FA, dále metanolu a Milli-Q vody s 0,1% FA, ACN s 0,1% FA a 25 mM mravenčanu amonného (pH = 3,2), v neposlední řadě pak v prostředí 5 mM octanu amonného (pH = 5,8) a ACN. Chromatogram (Obr. 21) poukazuje na předpokládaný záznam signálu, a tedy na retenci oximu v čase 0,3 – 0,5 min. Jedná se však o mrtvý objem, kdy nedošlo k žádné interakci oximu se SF. Došlo tak k velmi rychlé eluci oximu kolonou v proudě polární MF.



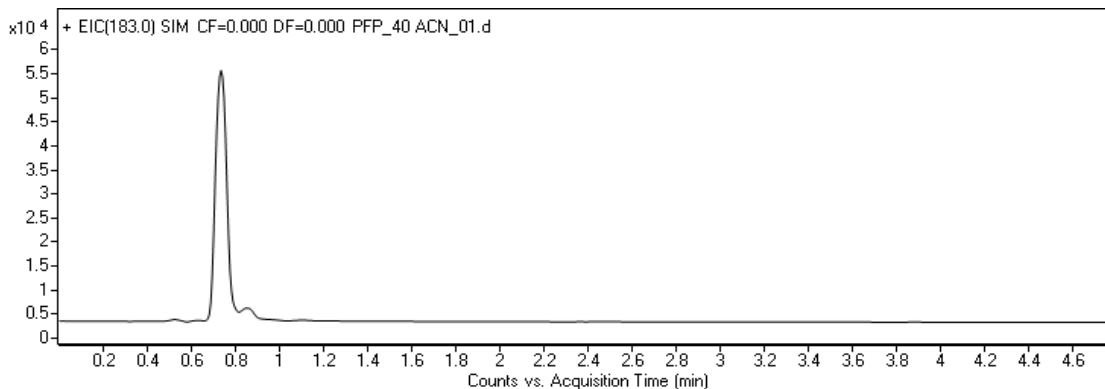
Obr. 21: Chromatogram oximu K870 analyzovaného na koloně C₁₈ v prostředí 25 mM mravenčanu amonného (pH = 3,2) a acetonitrilu s 0,1% FA.

4.1.3 Chromatografická analýza oximu K870 na Pentafluorofenyl propylové koloně (PFP)

Pentafluorofenyl propylová kolona je perspektivní kolonou pro zkoumání fyzikálně-chemických vlastností sloučenin s potenciálem léčebných účinků. Tato kolona umožňuje kromě hydrofobních interakcí také iontové interakce, vodíkové vazby, dipól-dipól interakce a aromatické interakce π - π vazeb (Yang, et al., 2010). Při zvýšené koncentraci organické fáze dochází ke zvýšené retenci pozitivně nabitých pyridinových oximů na iontoměničči PFP stacionární fáze. Naopak snížením podílu ACN v MF dochází ke zvýšení účinku jiných separačních mechanismů, mezi které patří například hydrofobnost. Konkrétně délka alifatického řetězce mezi dvěma pyridinovými jádry hraje významnou roli v lipofilnosti/hydrofilnosti těchto sloučenin (Dohnal, et al.).

Oximy obsahují jednu nebo dvě pyridinové jednotky, které jsou zdrojem π -elektronů. Interakce π - π vazeb mají vliv na retenci, zejména v prostředí se sníženým obsahem ACN. Trojná vazba acetonitrilu pak soutěží s oximovými a pyridinovými částmi analytu o interakce s fenolovými skupinami SF (Dohnal, et al.).

Separace oximu K870 probíhala na koloně Kinetex PFP 3 mm x 75 mm, 2,6 μ m v prostředí ACN a Milli-Q vody + 0,1% FA. Chromatogram poskytuje pík hmoty 183 v retenčním čase 0,7 – 0,9 min (Obr. 22). Jedná se o výrazný pík pokračující v menší pík, který zastupuje možné izomery v oximech. Aldoximová skupina oximů může být prezentována ve dvou geometrických izomerech: syn-izomer (syn) nebo anti-izomer (anti). U molekul obsahujících dvě aldoximové skupiny může dojít k vytvoření tří konformačních možností: syn-syn, syn-anti a anti-anti. Tato případná izomerie se projevuje již výše zmíněným zmenšeným píkem u sledované hmoty (Musilek, et al., 2008).

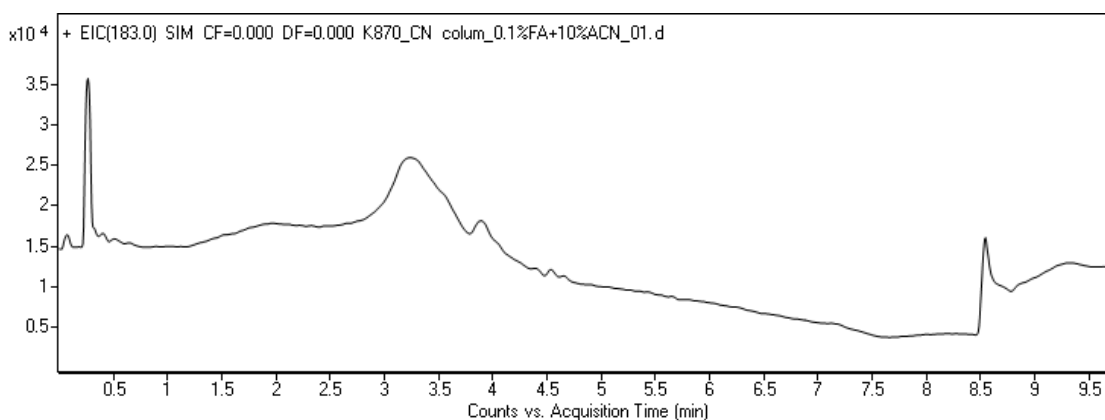


Obr. 22: Chromatogram oximu K870 analyzovaného na PFP koloně v prostředí acetonitrilu a Milli-Q vody s 0,1% kyselinou mravenčí.

4.1.4 Chromatografická analýza oximu K870 na kyano koloně (CN kolona)

Tato kolona je stericky chráněná a její diisopropyl kyanopropyl silanová SF je chemicky stabilní a poskytuje delší životnost kolony. Kyano kolona je vhodná zejména pro aplikace, které využívají detektory s vysokou citlivostí, a které vyžadují nízké pozadí. Proto je tato kolona vhodná zejména ve spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Využití kolony je možné v případě zásaditých, neutrálních, ale i kyselých sloučenin. Ionizovatelné sloučeniny (bazické, kyselé) jsou na této koloně obecně nejlépe separovány při pH = 3. Velmi bazické sloučeniny však mohou vyžadovat přidání zásaditých modifikátorů do MF (např. 10–20 mM dimethyloctylaminu), (Agilent).

Separace oximu K870 probíhala na koloně Zorbax SB-CN RR HD 2,1 mm x 50 mm, 1,8 μ m. Během analýzy byla mobilní fází směs Milli-Q vody s 0,1% FA a ACN s 0,1% FA. Měření probíhalo se dvěma typy gradientů. Při prvním měření byl počáteční gradient nastaven na složení MF z 90 % ACN s 0,1% FA a z 10 % Milli-Q vody s 0,1% FA. Při druhé analýze byl gradient obrácený, tudíž počáteční složení směsi bylo 90 % Milli-Q vody + 0,1% FA a 10 % ACN + 0,1% FA. I přesto, že Kabra et al. (Kabra, et al., 1981) uvádí, že trojná vazba nitrilu poskytuje vynikající selektivitu při separaci izomerů s dvojnou vazbou, při obou analýzách bylo patrné, že kyano kolona není vhodnou chromatografickou kolonou pro separaci oximu K870, jelikož docházelo k jeho rychlé eluci v prostředí polárních rozpouštědel. Retence píku v čase od 0 – 0,5 min je retence v mrtvém objemu, která se tak nedá brát v úvahu (Obr. 23). Chromatogram je vyextrahován z analýzy, kde na počátku separace MF obsahovala malé množství ACN s 0,1% FA a lze tak tedy říct, že se s nárůstem organického rozpouštědla zrychluje eluce oximu K870 kyano kolonou.

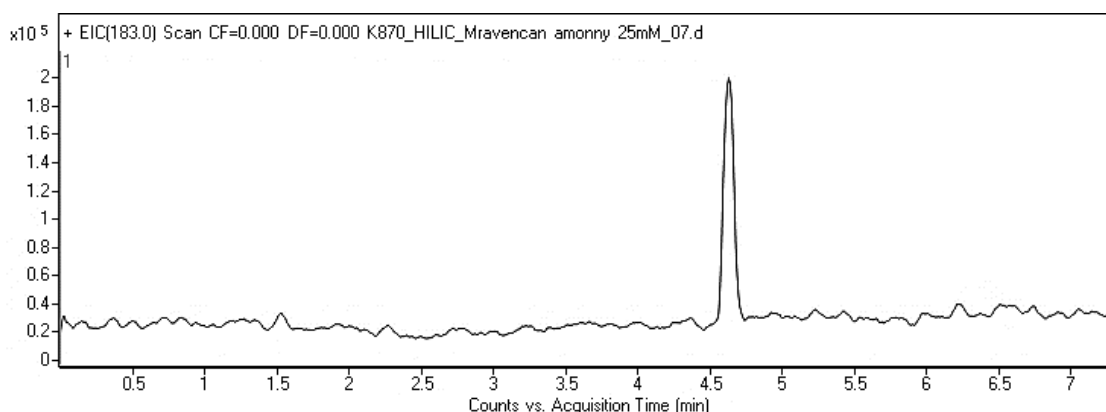


Obr. 23: Chromatogram oximu K870 na SB-CN koloně v prostředí ACN s 0,1% FA a Milli-Q vody s 0,1% FA.

4.1.5 Chromatografická analýza oximu K870 na Hydrofilní interakční koloně (HILIC kolona)

Hydrofilní interakční kolona je velmi oblíbená pro své využití na separaci polárních látek. Tento typ kolony má SF nejčastěji tvořenou oxidem křemičitým a MF s vysokým obsahem organického rozpouštědla, obvykle ACN. V tomto chromatografickém režimu je separace založena na rozdělení mezi eluentem mobilní fáze a vodou adsorbovanou na polární stacionární fázi kolony. Během chromatografických separací na HILIC koloně se mezi analytem a SF uplatňují interakce, jako jsou: výměna iontů, vodíkové vazby a dipól-dipól interakce. Podle složení MF a typu analyzované látky se uplatňují některé z těchto interakcí. HILIC kolona nabízí vysokou citlivost zejména ve spojení s detekcí na hmotnostním spektrometru, za využití elektrosprejové ionizace (Sentkowska, et al., 2019).

Analýzy oximu K870 probíhaly na koloně Zorbax Hilic Plus RR HD 2,1 mm x 50 mm, 1,8 μm . Na této koloně bylo provedeno několik analýz s různými mobilními fázemi: 5 mM octan amonný (pH = 5,8), 25 mM mravenčan amonný (pH = 3,2), ACN, ACN + 0,1% FA, Mili-Q voda a Mili-Q voda + 0,1% FA. Na základě několika měření, bylo zjištěno, že vhodnou mobilní fází pro separaci oximu K870 je ACN + 0,1% FA a 25 mM mravenčan amonný (pH = 3,2). Toto prostředí udržuje náboj na pyridinových jádrech oximu a zajišťuje jeho dostatečnou interakci se stacionární fází kolony. Na chromatogramu došlo k eluci hmoty 183 v retenčním čase 4,5 – 4,7 min (Obr. 24), což značí skutečnost, že oxim K870 v tomto uspořádání mobilní a stacionární fáze vytváří poměrně pevnou interakci se SF, a tak dochází k jeho pozdější eluci z kolony. Eluci pak podporuje rostoucí gradient vodné fáze. Separace na HILIC koloně byly neúčinnější a nejselektivnější. Proto lze říci, že HILIC kolona v prostředí ACN + 0,1% FA a 25 mM mravenčanu amonného je vhodným prostředím pro analýzu oximu K870.



Obr. 24: Chromatogram oximu K870 analyzovaného na HILIC koloně, v prostřední 25 mM mravenčanu amonného (pH = 7,4) a ACN s 0,1% FA.

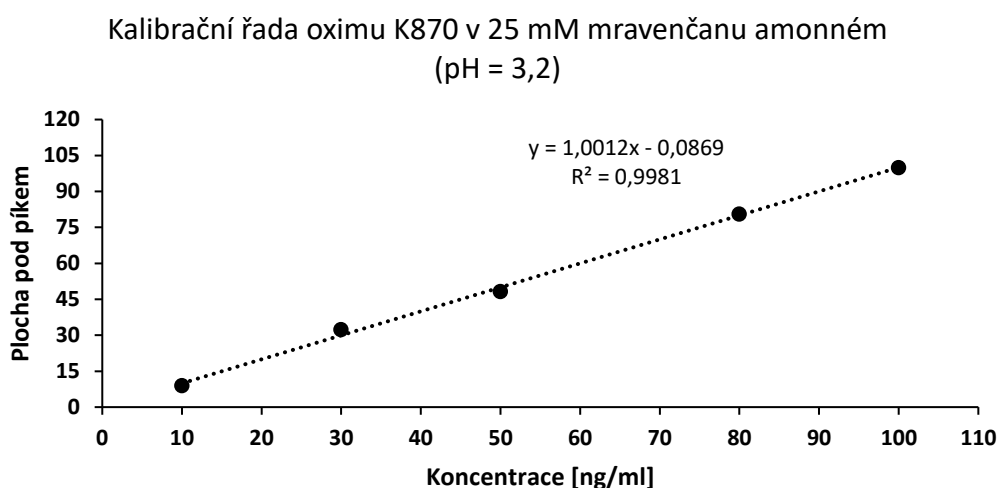
Studie profilování základních parametrů testovaných látek se často provádějí za použití chromatografie s reverzní fází, a to díky její robustní a reprodukovatelné separační charakteristice a pokrytí širokého spektra metabolitů. Většina biologických matric však obsahuje velké množství polárních metabolitů, které nelze udržet na reverzních stacionárních fázích. Proto se hydrofilní interakční kapalinová chromatografie stala stále populárnější v oblasti metabolomiky, zejména pak pro separaci polárních sloučenin. Tato kolona je vhodná pro velmi polární látky, avšak její schopnost separace je závislá na vhodně zvoleném pH a koncentraci pufovacích solí. Nejběžněji používanými pufrů jsou mravenčan amonný nebo octan amonný (Sillner, et al., 2019). Proto byly i v našem případě zvoleny tyto pufrů, tedy 25 mM mravenčan amonný (pH = 3,2) a 5 mM octan amonný (pH = 5,8). Při porovnání separací v obou pufrůch, bylo patrné, že takto polární molekula se lépe eluuje v prostředí mravenčanu amonného. Jiné kolony, jako C₈, C₁₈ a CN kolony disponují nepolární stacionární fází, tudíž není možné dosáhnout stejné retence oximu K870 na jejich SF, jako v případě HILIC kolony. Studie Pedrosy et al. (Pedroso, et al., 2016) uvádí, že přestože je chromatografie na reverzních fázích vynikající pro látky se střední a nízkou polaritou, většina farmaceutických složek je vysoce polárních a vyžadují tak polární mobilní fázi k dosažení odpovídající retence.

4.1.6 Zpracování biologických vzorků

Před samotným měřením bylo nutné zvolit vhodný extrakční postup, pro tento oxim v biologických vzorcích. Proto byla využita metoda dle Folcha et al. (Folch, et al., 1957), která uvádí extrakci v chloroformu, metanolu a vodě. Chloroform slouží jako solvatační činidlo pro lipidy, metanol je precipitačním činidlem pro proteiny a vodné prostředí je nejvhodnějším prostředím pro přechod oximů z biologických vzorků. Pro extrakci oximu K870 byl namísto vody používán 25 mM mravenčan amonný (pH = 3,2), protože v tomto pufru je oxim stabilnější než v Mili-Q vodě a zároveň se jedná o složku MF.

Na počátku byla prováděna extrakce pouze oximu K870 rozpuštěného v pufru 25 mM mravenčanu amonného (pH = 3,2), pro zjištění účinnosti této extrakční techniky. Byla tak vytvořena kalibrační řada oximu v koncentracích 10, 30, 50, 80 a 100 ng/ml. Extrakce pak byla prováděna pro každou koncentraci oximu, přičemž výsledkem bylo sledování přechodu oximu z organické fáze do pufru (Graf 1). Po extrakci tak byla odebírána horní vodná fáze a následně filtrována přes 0,22 µm stříkačkový filtr. Tyto vzorky pak byly proměřeny výše uvedenou MRM metodou (4.1.1) na hmotnostním spektrometru s HILIC kolonou v prostředí MF: ACN + 0,1% FA a 25 mM mravenčanu amonného (pH = 3,2).

Jak je z grafu patrné, během extrakce došlo ke značnému přechodu oximu K870 do vodné fáze, a lze tak tedy tuto metodu považovat za vhodnou extrakční techniku pro oxim K870. Touto extrakční technikou byly stejným způsobem extrahovány vzorky plazmy, moče, ledvin, jater a žluče z myší.



Graf 1: Kalibrační řada extrahovaného oximu K870 v koncentracích 10, 30, 50, 80 a 100 ng/ml.

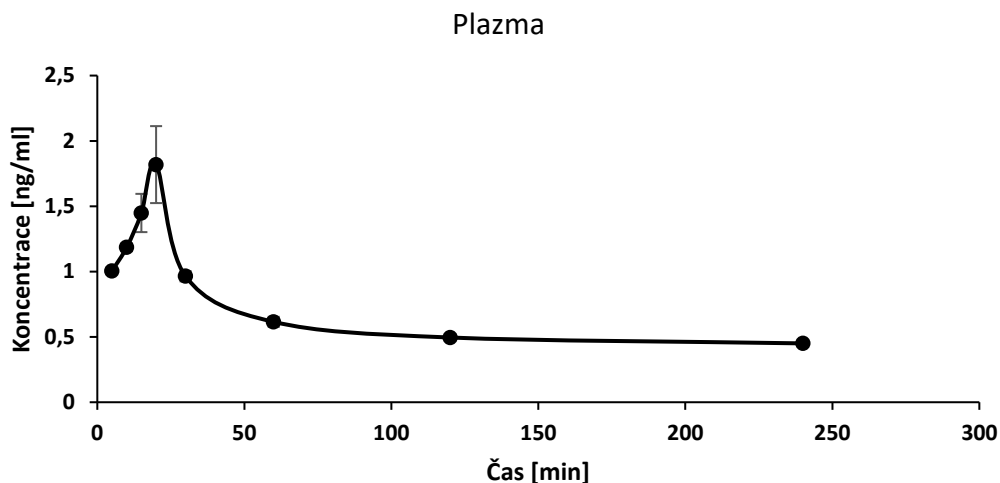
4.2 Analýza farmakokinetiky oximu K870

Farmakokinetika je věda, zabývající se pohybem xenobiotik organizmem, tudíž popisuje jejich absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci. Během testování potenciálních léčiv, jako jsou právě oximy, je nutné pochopit jejich farmakokinetickou variabilitu. Zejména pak faktory ovlivňující biologickou dostupnost, fyzikálně-chemické interakce, farmakokinetické interakce a metabolismus léčiva při průchodu organizmem (Eusuf, et al., 2019).

Analýza farmakokinetiky, zejména pak exkrece oximu K870, byla stanovovaná z plazmy, moče, jater, žluče a ledvin myší. Prostup oximu K870 přes hematoencefalickou bariéru bylo tématem jiné práce. Po nastavení vhodné LC-MS metody, tedy měření na HILIC koloně v MRM módu v prostřední 25 mM mravenčanu amonného (pH = 3,2) a ACN + 0,1% FA, byly touto metodou proměřeny všechny biologické vzorky obsahující oxim K870. Veškeré biologické vzorky však byly ještě podrobeny extrakční technice dle Folcha et al. (Folch, et al., 1957) v chloroformu, metanolu a 25 mM mravenčanu amonném.

4.2.1 Analýza oximu K870 v plazmě

Plazma byla myším odebrána v časových intervalech 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 a 240 minut od podání oximu. Pro stanovení oximu K870 v každém časovém sběru, byly tyto vzorky plazmy podrobeny výše uvedené extrakci. V plazmě se nachází značné množství proteinové i lipidické složky, proto byla velmi nutná extrakce oximu K870 právě v chloroformu, metanolu a pufru, do kterého oxim přecházel. Protože byl oxim K870 podáván per orálně, byla předpokládána jeho vysoká koncentrace zejména v počátečních časových intervalech sběru plazmy (Graf 2).



Graf 2: Analýza koncentrace oximu K870 v plazmě myši, odebírané v časových intervalech 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 a 240 minut.

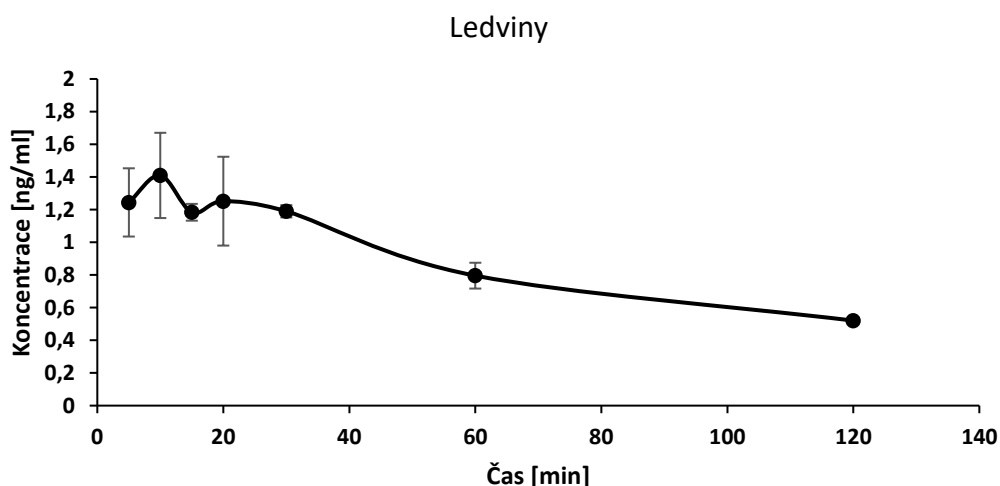
Z uvedeného grafu je patrné stejně jako v publikaci Malfattiho et al. (Malfatti, et al., 2017), že k největšímu nárůstu koncentrace oximu K870 došlo v rozmezí 5-20 minutách od podání oximu, což souvisí s rychlostí distribuce látek v plazmě. Následně pak došlo k postupnému úbytku oximu, kdy po 20 minutách je zřetelná jeho eliminace z plazmy. Oximy jsou vysoce polární látky, které jsou rychle transportovány plazmatickými transportéry do celého organismu. Následně dochází k jejich rychlé eliminaci do ledvin, a to glomerulární filtrací a aktivní tubulární sekrecí (Žďárová Karasová, et al., 2012). Poté byl oxim K870 exkretován močí, což vysvětluje téměř nulovou hodnotu koncentrace oximu v odběru plazmy po 60 minutách od jeho podání.

4.2.2 Analýza oximu K870 v ledvinách

Další sledovanou tkání byly ledviny z myši. Protože jsou oximy dobře rozpustné ve vodě, je předpokládána jejich rychlá eliminace z plazmy do ledvin. V ledvinách se oximy dostávají do styku s biotransformačními enzymy, metabolizujícími tyto látky na jednodušší a polárnější metabolity, které jsou z organismu snadno eliminovány močí (Chillistone, et al., 2017). Oximy se dostávají do ledvin filtrací, kde dochází k jejich prostupu mezibuněčnými spoji a póry v glomerulárním tubulu a následně prochází celým systémem ledviny s konečnou exkrecí do moče (Katzung, 2017), (Wilkinson, et al., 2008).

Ledvinná tkáň byla odebírána v časových intervalech 5, 10, 15, 20, 30, 60 a 120 minut. Také pro ledviny byla použita extrakční metoda dle Folcha, jako v případě plazmy

s následnou detekcí na hmotnostním spektrometru v MRM módu se stejnou mobilní i stacionární fází, jako v případě plazmy a kalibrační řady oximu K870. Z níže uvedeného grafu lze vyzorovat, že v prvních pěti minutách od podání oximu, je jeho koncentrace v ledvinách nízká, jelikož v tomto časovém úseku ještě docházelo k distribuci oximu plazmou, zajištěnou proteinovými transportéry (Graf 3), (Malfatti, et al., 2017). Po pěti minutách od podání oximu, se začala jeho koncentrace v ledvinách zvyšovat. Lze tedy říci, že distribuce oximu K870 z plazmy do ledvin nastává po pěti minutách od jeho podání. Poté se však oxim začal eliminovat do moče, protože u odběrů z časových úseků 15, 20, 30 a 60 minut došlo k poklesu koncentrace oximu K870 v ledvinách. V odběrech ledvinné tkáně 120 minutách je již koncentrace oximu téměř nulová, protože došlo k jeho eliminaci do moče.



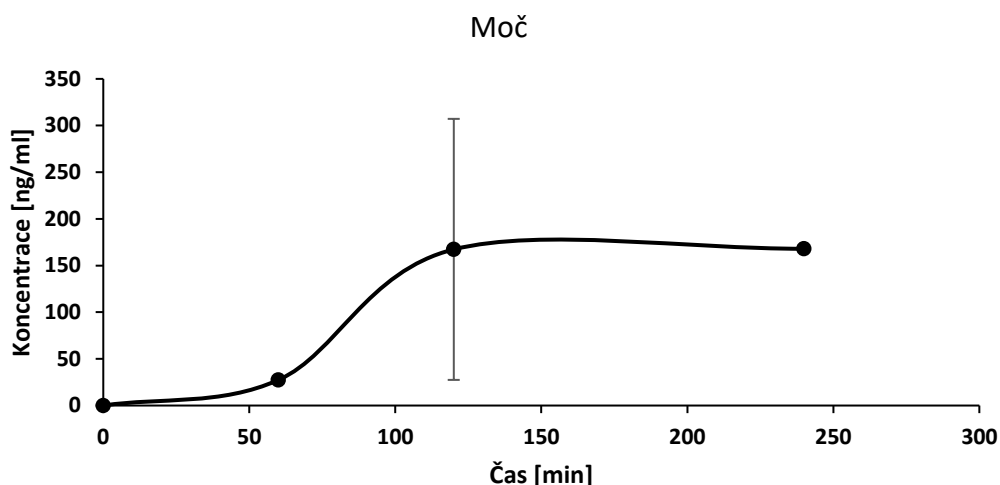
Graf 3: Analýza koncentrace oximu K870 v ledvinách myši, odebíraných v časových intervalech 5, 10, 15, 20, 30, 60 a 120 minut.

4.2.3 Analýza oximu K870 v moči

Koncentrace oximu K870 v moči myši, byla analyzována ve vzorcích odebraných v časových intervalech 60, 120 a 240 minut. Analýza opět probíhala v MRM módu v prostředí 25 mM mravenčanu amonného (pH = 3,2) a ACN + 0,1% FA na HILIC koloně. Protože koncentrace oximu K870 po 20 minutách od jeho podání v plazmě klesá, a v ledvinách po 5 minutách roste, je pravděpodobné, že koncentrace oximu v moči bude postupně stoupat, protože aktivní tubulární sekrecí dochází k exkreci oximu z organismu.

Analýzou moče bylo zjištěno, že po 60 minutách od podání oximu K870 dochází k nárůstu koncentrace oximu K870 v moči. Tato koncentrace stoupá až do 120 minut od podání s následným poklesem, kdy je po 240 minutách část oximu eliminována

z organismu (Graf 4). Při porovnání grafů plazmy, ledvin a moče lze říci, že při podání oximu K870 dochází do 5 minut k jeho rychlému nárůstu v plazmě, zároveň se do 10 minut zvyšuje také jeho koncentrace v ledvinách, a po 60 minutách, kdy je koncentrace oximu v plazmě velmi nízká, dochází k výraznému zvýšení obsahu oximu v moči. Existuje tak zřetelná rovnováha mezi distribucí oximu K870 v plazmě, v ledvinách a moči.

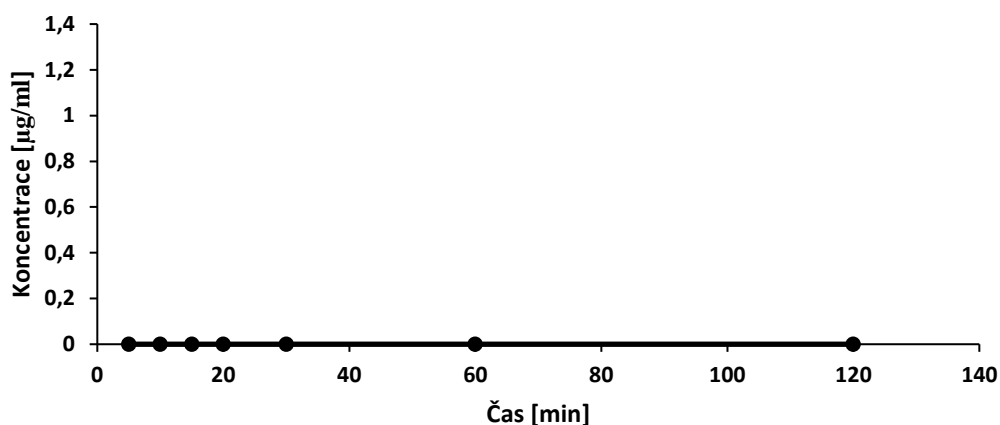


Graf 4: Analýza koncentrace oximu K870 v moči z myši, odebírané v časových intervalech 60, 120 a 240 minut.

4.2.4 Analýza oximu K870 v játrech a žluči

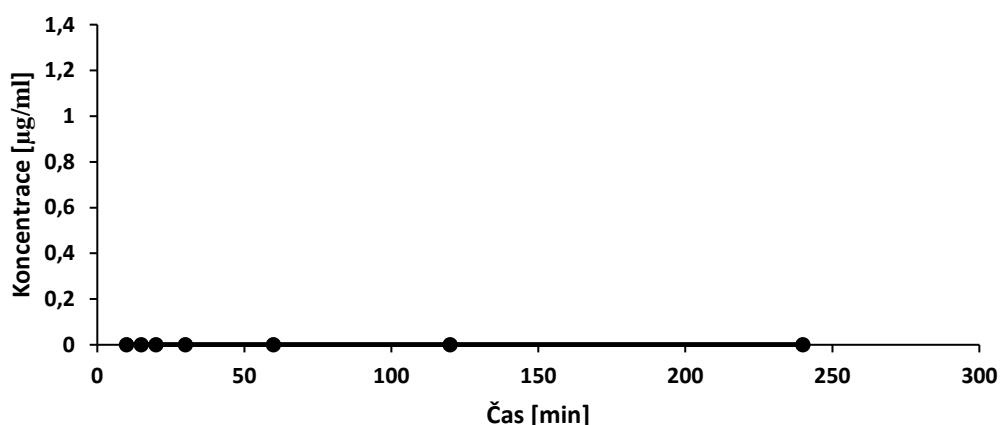
Stanovením koncentrace oximu K870 v játrech a žluči myši, bylo zjištěno, že tento oxim není distribuován ani do jater ani do žluče, protože je z důvodu své vysoké polaritě velmi rychle eliminován z plazmy do ledvin a následně močí exkretován z organismu. Játra byla odebíraná v časových intervalech 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120 a 240 minut, kdežto žluč v 10, 15, 20, 30, 60 a 120 minutách. V obou tkáních je koncentrace oximu nulová ve všech časových intervalech (Graf 5, Graf 6).

Játra



Graf 5: Analýza koncentrace oximu K870 v játrech myši, odebíraných v časových intervalech 5, 10, 20, 30, 60, 120 a 240 minut.

Žluč



Graf 6: Analýza koncentrace oximu K870 ve žluči myši, odebírané v časových intervalech 10, 15, 20, 30, 60 a 120 minut.

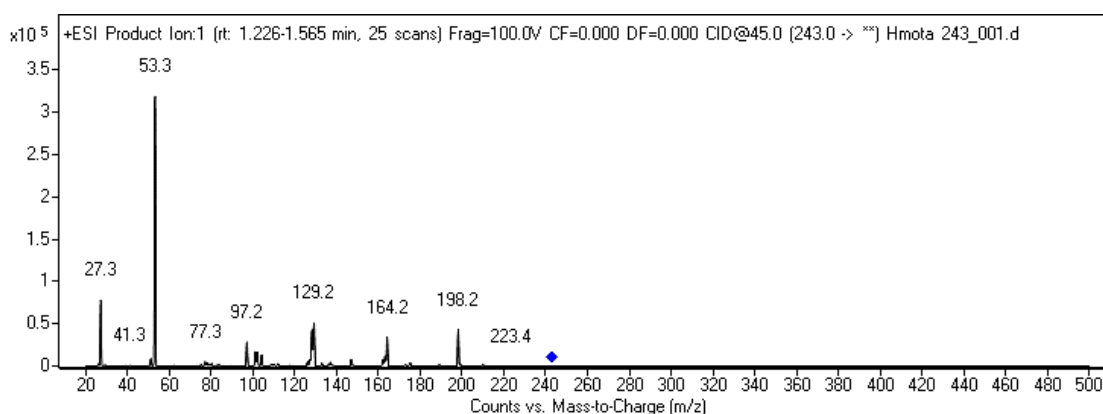
4.3 Farmakodynamika oximu K870

Farmakodynamika je vědní obor, zabývající se účinky léčiv na organismus. Tyto účinky se pak rozvíjí v různých orgánech a tkáních a společně s homeostatickými ději vytváří odpověď organismu na podání léčiva (Švihovec, et al., 2018). Po distribuci léčiva do tkání, dochází k biotransformačním reakcím mezi léčivem a enzymy, které pak vedou ke vzniku metabolitů. Biotransformační reakce obecně konvertují základní sloučeniny na polární a hydrofilní metabolity, které jsou poměrně rychle vylučovány ledvinami. Léky a další xenobiotika jsou biotransformovány ve dvou fázích. Během první fáze biotransformace dochází především k oxidaci, redukci, hydrolýze a metylaci výchozích látek. Hlavním biotransformačním orgánem jsou játra, která obsahují velké množství

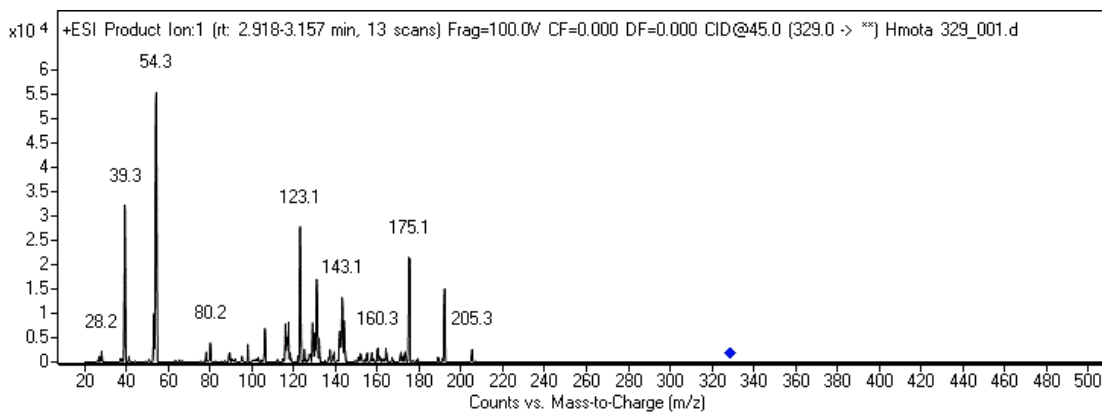
biotransformačních enzymů (např. CYP 450) (Tarloff, et al., 2004). Proto také byla zaváděna metoda inkubace oximu K870 s jaterními mikrozomy a cytosolem (3.4.1), za účelem sledování možných metabolitů toho oximu. Během celé práce byla studována pouze první fáze biotransformace, nikoli následný vznik konjugátu např. s glutathionem.

Při studiu farmakokinetiky oximu K870 v játrech, žluči, ledvinách, plazmě a moči myši, bylo zjištěno stejně jako ve studii Žďárové-Karasové et al. (Žďárová Karasová, et al., 2012), že jsou oximy natolik polární, že při jeho distribuci organismem dochází k velmi rychlému přechodu z plazmy do ledvin, s následnou eliminací do moče. Velmi rychlá eliminace oximu K870 zapříčiňuje jeho nulovou koncentraci v játrech a ve žluči, což je patrné z grafů 5 a 6. Toto zjištění potvrdila modelová inkubace oximu s jaterními mikrozomy a cytosolem (3.4.1), kdy nebyla detekována žádná dominantní hmota po půl hodinové inkubaci s těmito organelami, jako v případě Malfattiho et al. (Malfatti, et al., 2017). Z tohoto důvodu, byla metabolizace oximu K870 směřována na plazmu a ledvinou tkáň, případně i možné metabolity exkretované do moče.

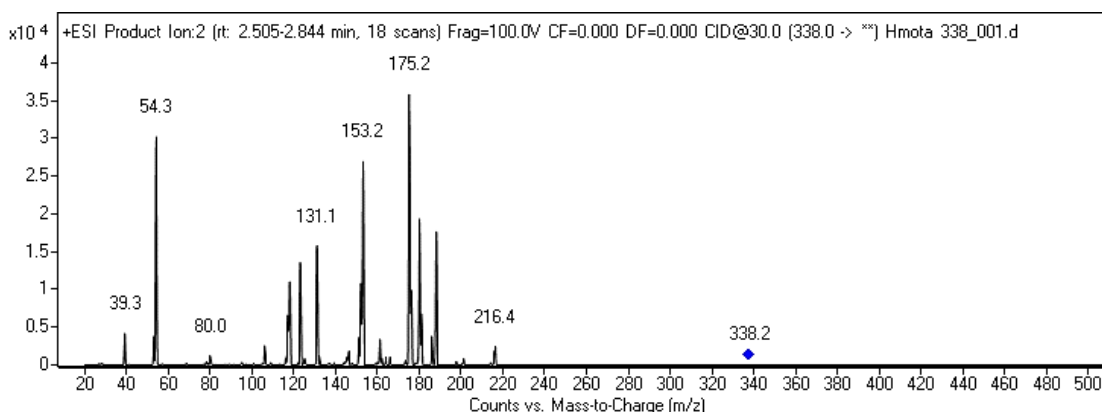
Komparativní analýzou vzorků exponovaných oximu K870 se vzorky odebranými před podáním tohoto oximu, byly shledány jeho možné metabolity. Pro další studii tak byly vybrány hmoty, které vykazovaly izotopové obálky chloru a výraznou dominanci ve vzorcích po podání oximu K870, a tedy hmoty s $m/z = 244, 330$ a 339 . Tyto hmoty byly fragmentovány při kolizních energiích 5, 15, 30 a 45 eV (Obr. 25, Obr. 26, Obr. 27). Po fragmentaci byly u všech výše uvedených hmot vyzorovány podobné fragmenty, jako u parentní látky ($m/z = 183$), což mohlo naznačovat strukturní podobnost mezi jednotlivými komponentami.



Obr. 25: Fragmentační spektrum hmoty 243, při kolizní energii 45 eV.

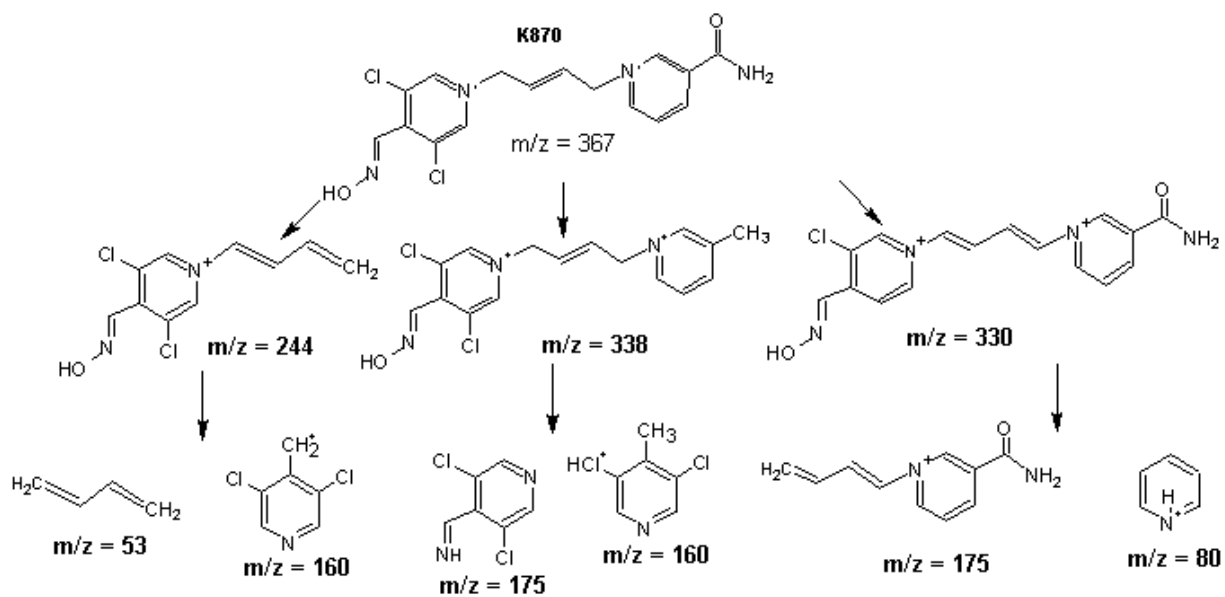


Obr. 26: Fragmentační spektrum hmoty 329, při kolizní energii 45 eV.



Obr. 27: Fragmentační spektrum hmoty 338, při kolizní energii 30 eV.

Tato experimentálně získaná fragmentační spektra byla porovnána s *in-silico* daty v *Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification* softwaru (CFM-ID). Tím byly nalezeny shody pro sdílené fragmenty sledovaných hmot (Obr. 28). Avšak zatím se jedná pouze o možné metabolity, protože jejich přesné určení by vyžadovala důkladnější analýza, která nebyla cílem této práce. Pro identifikaci možných metabolitů byly vybrány hmoty, sdílené mezi jednotlivými fragmentačními spektry (Obr. 25, Obr. 26, Obr. 27). Z těchto spekter je patrná shoda ve hmotách $m/z = 53, 80, 161$ a 175 . Tyto hmoty však mohou vykazovat rozdílný strukturní vzorec pro každou hmotu, proto jsou v Obr. 28 uvedeny například dva strukturní vzorce pro hmoty $m/z = 175$ a 160 . V případě, že by byl oxim K870 metabolizován v játrech, podléhal by významným biotransformačním přeměnám v přítomnosti cytochromů a tato metabolizace by mohla být naznačena pomocí XenoSite softwaru (XenoSite). Jedná se však o vysoce polární látku, která metabolizaci v játrech nepodléhá, a tak lze jeho metabolity v tomto měřítku pouze předpovídat.



Obr. 28: Možné metabolity oximu K870 a jejich pravděpodobné fragmenty.

ZÁVĚR

Protože jsou organofosfátové sloučeniny široce využívanými látkami, jejich studie syntézy, mechanismu účinku a dopadu na životní prostředí se stále rozvíjí. Tyto sloučeniny zaznamenaly největší uplatnění jako pesticidy a bojové látky především s nervově paralytickým účinkem, ať už pro člověka, tak živočichy obecně. Devizou těchto látek je inhibice aktivity acetylcholinesterázy v nervových zakončeních, čímž významně omezují šíření nervového vzruchu a narušení homeostázy v organismu. Jedná se o závažná poškození, která souvisí s následným rozvojem oxidativního stresu a toxickým dopadem pro nervový systém, plíce, ledviny, játra a několik dalších orgánových struktur. Tato poškození mohou vyústit ve stále populačně se rozšiřující onemocnění, kterými jsou především Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba. V obou případech se jedná o neurodegenerativní onemocnění, která souvisí s narušením axonů v centrální nervové soustavě. Příčina těchto onemocnění stále není zcela známa, stejně tak jako jejich léčba.

Organofosfátové sloučeniny jsou velmi nebezpečnými vojenskými zbraněmi, mezi které řadíme například sarin, soman a tabun. Tyto látky způsobují závažné otravy, proti kterým se stále vyvíjí univerzální lék. Důležitým faktorem pro přípravu takového léčiva je jeho dobrá prostupnost hematoencefalickou bariérou. Tato vlastnost byla vyzkoušena u oximů, které jsou společně s atropinem a diazepamem využívány při léčbě organofosfátových otrav. Před zavedením takového oximu do preklinické studie je nutná analýza jeho farmakokinetických a farmakodynamických parametrů. V této diplomové práci byla sledována farmakokinetika a farmakodynamika oximu K870 v biologických vzorcích z myší. Jejich analýzou bylo zjištěno, že je tento oxim velice rychle distribuován krevní plazmou do organismu s následnou eliminací do ledvin, kde oxim podléhá biotransformaci a jeho případné metabolity jsou okamžitě exkretovány do moče. Tyto údaje by bylo vhodné doplnit o prostupnost oximu K870 hematoencefalickou bariérou, avšak tento parametr byl náplní jiné práce. Po komparativní analýze naměřených spekter, byly shledány hmoty, jež by mohly být teoretickými metabolity studovaného oximu, což by napovídalo jeho terapeutickému účinku. Nutno však podotknout, že se jedná o vysoce polární látku, která nepodléhá biotransformaci v játrech a ve žluči, a proto se o výše zmíněných metabolitech oximu hovoří pouze jako o teoretických.

5 Seznam použité literatury

- Agilent.** Agilent Zorbax Rapid Resolution High Definition SB-CN Column Data Sheet. *Agilent.* [Online] Agilent. [Cited: 05 02, 2019.] <https://www.agilent.com/cs/library/datasheets/public/820210-005.pdf>.
- An, Hedi, et al. 2018.** Quantifying iron deposition within the substantia nigra of Parkinson's disease by quantitative susceptibility mapping. *Journal of the Neurological Sciences.* 2018, 386, pp. 46-52.
- Association, Alzheimer's. 2010.** 2010 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia.* 2010, 6, pp. 158-194.
- Bajgar, Jiri. 2012.** *Nevre Agents Poisoning and its Treatment in Schematic Figures and Tables.* s.l. : Elsevier, 2012. pp. 45-61. ISBN: 978-0-12-416047-7.
- Ballabh, Praveen, Braun, Alex and Nedergaard, Maiken. 2004.** The blood-brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implicatios. *Neurobiology of Disease.* 2004, 1, pp. 1-13.
- Ballatore, Carlo, Lee, Virginia, M.-Y. and Trojanowski, John Q. 2007.** Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuroscience.* 2007, 8, pp. 663-672.
- Berneschi, Simone, et al. 2018.** A waveguide absorption filter for fluorescence measurements. *Sensor and Actuatros B.* 2018, 1-9.
- Bodor, Nicolae, Shek, Efraim and Higuchi, Takeru. 1976.** Improved Delivery through Biological Membranes. 1. Synthesis and Properties of 1 -Methyl- 1,6-dihydropyridine-2-carbaldoxirne, a Pro-Drug of N-Methylpyridinium-2-carbaldoxime Chloride. *Journal od Medicinal Chemistry.* 1976, 19, pp. 102-107.
- Bzonek, Petr. 2019.** Analýza obsahu oximu K870 a jeho metabolitů v biologických vzorcích metodou HPLC-MS. *Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce PharmDr. Rudolf Andryš, PhD., 60 s.* 2019.
- Castro, Alexandre T. and Figueroa-Villar, Jose D. 2002.** Molecular Structure, Conformational Analysis and Charge Distribution of Pralidoxime: Ab Initio and DFT Studies. *International Journal of Quantum Chemistry.* 2002, 89, pp. 135-146.
- CFM-ID.** Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification. [Online] [Cited: 05 03, 2019.] <http://cfmid.wishartlab.com/?fbclid=IwAR3FjRAF3-mgzokXeZe8UFZ1vqsizV2dUZMJTUI1TrM7OezuQ7ODL0aBtRE>.

- Corrie, Kathryn and Hardman, G. Jonathan. 2017.** Mechanisms of drug interactions: pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Anesthesia&Intensive Care Medicine*. 2017, 7, pp. 331-334.
- Čolović, B. Mirjana, et al. 2013.** Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*. 2013, 11, pp. 315-335.
- Dardiotis, Efthimios, et al. 2019.** Paraoxonase-1 genetic polymorphisms in organophosphate metabolism. *Toxicology*. 2019, 411, pp. 24-31.
- Dohnal, Vlastimil, Musilek, Kamil and Kuca, Kamil.** Retention Behavior of Pyridinium Oximes on PFP Stationary Phase in High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 52, pp. 246-251.
- Dong, Yixuan, et al. 2019.** A Kinetic Approach to Determining Drug Distribution in Complex Biphasic Systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019, pp. 1-10.
- Ekman, Rolf, et al. 2008.** *Mass Spectrometry instrumentation, interpretation and applications*. s.l. : Wiley-Interscience serie in mass spectrometry, 2008. pp. 8 - 96. ISBN: 978-0-471-71395-1.
- Eusuf, Danielle V. and Thomas, Elizabeth. 2019.** Pharmacokinetic variation. *Anesthesia&Intensive Care Medicine*. 2019, 20, pp. 126-129.
- Fanali, Salvatore, et al. 2013.** *Liquid Chromatography*. s.l. : Elsevier, 2013. ISBN: 978-0-12-415806-1.
- Fischer, H., Gottschlich, R. and Seelig, A. 1998.** Blood-Brain Barrier Permeation: Molecular Parameters Governing Passive Diffusion. *The Journal of Membrane Biology*. 1998, 165, pp. 201-211.
- Folch, Jordi, Lees, M. and Stanley, Sloane H. 1957.** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 1957, 226, pp. 497-509.
- Franklin, C. Christopher, et al. 2009.** Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Molecular Aspects of Medicine*. 2009, 30, pp. 86-98.
- Geng, Xuhui, et al. 2018.** A compact and low-cost laser induced fluorescence detector with silicon based photodetector assembly for capillary flow systems. *Talanta*. 2018, 182, pp. 279-284.
- Georgiadis, G., et al. 2018.** Nephrotoxicity issues of organophosphates. *Toxicology*. 2018, 406-407, pp. 129-136.

- Georgiadis, G., et al. 2018.** Nephrotoxicity issues of organophosphates. *Toxicology*. 2018, 406-407, pp. 129-136.
- Hampel, Harald, et al. 2018.** The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain a Journal of Neurology*. 2018, 132, pp. 1-17.
- Harvey, David. 2000.** *Modern Analytical Chemistry*. s.l.: McGraw-Hill Higher Education, 2000. pp. 181-231. ISBN: 0-07-237547-7.
- Horn, Gabriele, et al. 2018.** Interactions between acetylcholinesterase, toxic organophosphorus compounds and a short series of structurally related non-oxime reactivators: Analysis of reactivation and inhibition kinetics in vitro. *Toxicology Letters*. 2018, 299, pp. 218-225.
- Huber, D. Jason, Egleton, Richard D. and Davis, P. Thomas. 2001.** Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends in Neurosciences*. 2001, 12, pp. 719-725.
- Hussain-Lukaszewicz, Anna. 2010.** Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity - Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2010, 98, pp. 145-150.
- Chillistone, Shruti and Hardman, Jonathan G. 2017.** Factors affecting drug absorption and distribution. *Anaesthesia&Intensive Care Medicine*. 2017, 7, pp. 335-339.
- . 2017. Modes of drug elimination and bioactive metabolites. *Anaesthesia&Intensive Care Medicine*. 2017, 9, pp. 458-461.
- Choi, Clark K. and Dong, Michael W. 2005.** 5 - Sample Preparation for HPLC Analysis of Drug Products. *Separation Science Technology*. 2005, 6, pp. 123-144.
- Inangil, Gökhan, et al. 2016.** How important is the butyrylcholinesterase level for cesarean section? *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*. 2016, 6, pp. 26-29.
- Jin, Jill. 2015.** Alzheimer Disease. *JAMA Patient Page*. 2015, 313, p. 1488.
- Jokanović, Milan and Kosanović, Melita. 2010.** Neurotoxic effects in patients poisoned with organophosphorus pesticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2010, 29, pp. 195-201.
- Jokanović, Milan. 2018.** Neurotoxic effects of organophosphorus pesticides and possible association with neurodegenerative diseases in man: A review. *Toxicology*. 2018, 410, pp. 125-131.

- Jokanović, Milan, et al. 2011.** Organophosphate induced delayed polyneuropathy in man: An overview. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. 2011, 113, pp. 7-10.
- Jonaković, Milan and P., Stojiljković Miloš. 2006.** Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *European Journal of Pharmacology*. 2006, 553, pp. 10-17.
- Jouanne, Marie, Rault, Sylvain and Chiret-Voisin, Anne-Sophie. 2017.** Tau protein aggregation in Alzheimer's disease: An attractive target for the development of novel therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, 139, pp. 153-167.
- Kabra, Pokar M. and Marton, Laurence J. 1981.** *Liquid Chromatography in Clinical Analysis*. s.l. : Humana Press, 1981. pp. 64-80. ISBN: 0-89603-026-1.
- Karade, N. Hitendra, et al. 2014.** Synthesis and in vitro evaluation of bis-quaternary 2-(hydroxyamino)-N-(pyridin-3-yl)acetamide derivatives as reactivators against sarin and VX inhibited human acetylcholinesterase (hAChE). *Bioorganic&Medicinal Chemistry*. 2014, 22, pp. 2684-2691.
- Katz, Francine S., et al. 2018.** New Therapeutic Approaches and Novel Alternatives for Organophosphate Toxicity. *Toxicology Letters*. 2018, 291, pp. 1-10.
- Katzung, Bertram G. 2017.** *Basic&Clinical Pharmacology*. s.l. : Mc Graw Hill Education, 2017. ISBN: 978-1259641152.
- Kazakevich, Yuri V. and LoBrutto, Rosario. 2007.** *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. New Jersey : Wiley-Interscience, 2007. pp. 11-12. ISBN: 978-471-68162-5.
- Kim, Jinwoo, et al. 2018.** Novel tacrine-pyridinium hybrid reactivators of organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase: Synthesis, molecular docking, and in vitro reactivation study. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*. 2018, 28, pp. 3784-3786.
- Korabecny, Jan, et al. 2014.** Pharmacotherapy of Alzheimer's Disease: Current State and Future Perspectives. *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*. 2014, pp. 3-39.
- Kromidas, Stavros. 2016.** *The HPLC Expert. Possibilities and Limitations of Modern High Performance Liquid Chromatography*. s.l. : Wiley-VCH, 2016. ISBN: 978-3-527-67762-7.
- Lakowicz, R. Joseph. 2006.** *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Baltimore : Springer, 2006. ISBN-13: 978-0-387-46312-4.

- Leroy-Trovaslet, Marie, et al. 2011.** Organophosphate hydrolases as catalytic bioscavengers of organophosphorus nerve agents. *Toxicology Letters*. 2011, 206, pp. 14-23.
- Lock, A. Edward and Reed, J. Celia. 1998.** Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Kidney. *Toxicologic Pathology*. 1998, 26, pp. 18-25.
- Lu, S. C. 2009.** Regulation of glutathione synthesis. *National institutes of health*. 2009, 30, pp. 42-59.
- Malfatti, Michael A., et al. 2017.** The biodistribution and pharmacokinetics of the oxime acetylcholinesterase reactivator RS194B in guinea pigs. *Chemico-Biological Interactions*. 2017, 277, pp. 159-167.
- Malik, Hasmat, et al. 2012.** UV/VIS Response Based Fuzzy Logic for Health Assessment of Transformer oil. *Procedia Engineering*. 2012, 30, pp. 905-912.
- Mostafalou, Sara and Abdollahi, Mohammad. 2013.** Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2013, 268, pp. 157-177.
- Muckova, L., et al. 2019.** Oxidative stress induced by oxime reactivators of acetylcholinesterase in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2019, 56, pp. 110-117.
- Mukrasch, M. D., et al. 2009.** Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution. *Plos Biology*. 2009, 2, pp. 399-414.
- Musil, Karel, et al. 2016.** Development and validation of a FIA/UV-Vis method for pKa determination of oxime based acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2016, 117, pp. 240-246.
- Musilek, Kamil, et al. 2008.** RP-HPLC determination of the lipophilicity of bispyridinium reactivators of acetylcholinesterase bearing a but-2-ene connecting linker. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, 391, pp. 367-372.
- Naughton, Sean X. and Terry, Alvin V. Jr. 2018.** Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology*. 2018, 408, pp. 101-112.
- Nýdlová, E., Vrbová, M. and Roušar, T. 2014.** Glutathione and glutathione-related enzyme system. *Diabetologie, metabolismus, endokrinologie, výživa*. 2014, 4, pp. 202-208.
- Oller-Salvia, Benjamí, et al. 2016.** Blood-brain barrier shuttle peptides: and emerging paradigm for brain delivery. *Chemical Society Reviews*. 2016, 17, pp. 4631-4852.

- Pajouhesh, Hassan and Lenz R., George. 2005.** Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. *NeuroRX*. 2005, 4, pp. 541-553.
- Passos, Marieta L. C., Lúcia, M. and Saraiva, M.F.S. 2019.** Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems and detection strategies. *Measurement*. 2019, 135, pp. 896-904.
- PBD. 2001.** *Protein Data Bank in Europe*. [Online] 17. 01 2001. [Citate: 27. 03 2019.] <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/1B41>.
- Pedroso, Tahisa M., Medeiros, Ana C. D. and Salgado, R. N. Herida. 2016.** RP-HPLC x HILIC chromatography for quantifying ertapenem sodium with a look at green chemistry. *Talanta*. 2016, 160, pp. 745-753.
- Pereira, Clayton R., et al. 2019.** A survey on computer-assisted Parkinson's Disease diagnosis. *Artificial Intelligence In Medicine*. 2019, 95, pp. 48-63.
- Piasecka-Markowicz, Magdalena, Huttunen, M. Kristiina and Sikora, Joanna. 2018.** Metformin and its sulphonamide derivative simultaneously potentiate anti-cholinesterase activity of donepezil and inhibit beta-amyloid aggregation. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2018, 33, pp. 1309-1322.
- Ranjan, Anuj, Chauhan, Abhishek and Jindal, Tanu. 2018.** In-silico and in-vitro evaluation of human acetylcholinesterase inhibition by organophosphates. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018, 57, pp. 131-140.
- Sachdev, Kanica and Gupta, Kumar Manoj. 2019.** A comprehensive review of feature based methods for drug target interaction prediction. *Journal of Biomedical Informatics*. 2019, 93, pp. 103-159.
- Samet-Mahjoubi, Amira, Fetoui, Hamadi and Zeghal, Najiba. 2008.** Nephrotoxicity induced by dimethoate in adult rats and their suckling pups. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2008, 91, pp. 96-103.
- Scott, D. O., et al. 2017.** Passive drug permeation through membranes and cellular distribution. *Pharmacological Research*. 2017, 117, pp. 94-102.
- Sean, X. Naughton and Alvin, V. Terry Jr. 2018.** Neurotoxicity in acute and repeated organophosphate exposure. *Toxicology*. 2018, 408, pp. 101-112.
- Sentkowska, Aleksandra and Pyrzynska, Krystyna. 2019.** HILIC Chromatography: Powerful Technique in the Analysis of Polyphenols. [book auth.] Ronald Ross Watson. *Polyphenols in Plants*. s.l. : Elsevier, 2019, pp. 341-351.

- Shargel, Leon and Yu, Andrew B.C. 2015.** *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. s.l. : McGraw Hill Education, 2015. pp. 1-50. ISBN: 978-0-07-183093-5.
- Sharma, Rahul, et al. 2016.** Synthesis and in-vitro reactivation screening of imidazolium aldoximes as reactivators of sarin and VX-inhibited human acetylcholinesterase (hAChE). *Chemico-Biological Interactions*. 2016, 259, pp. 85-92.
- Sillner, Nina, et al. 2019.** Development and application of a HILIC UHPLC-MS method for polar fecal metabolome profiling. *Journal of Chromatography B*. 2019, 1109, pp. 142-148.
- Sinha, N, and Dabla, P. K. 2015.** Oxidative stress and antioxidants in hypertension—a current review. *Current Hypertension Reviews*. 2015, 11, pp. 132-142.
- Švihovec, Jan, et al. 2018.** *Farmakologie*. s.l. : GRADA Publishing, 2018. pp. 5-70. 978-80-271-2150-2.
- Tan, De-Hong, et al. 2009.** Chronic organophosphate (OP)-induced neuropsychiatric disorder is a withdrawal syndrome. *Medical Hypotheses*. 2009, 72, pp. 405-406.
- Tan, Sean Hong, et al. 2019.** Emerging pathways to neurodegeneration: Dissecting the critical molecular mechanisms in Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019, 111, pp. 765-777.
- Tang, Shengzhuang, et al. 2019.** Hydrophilic scaffolds of oxime as the potent catalytic inactivators of reactive organophosphate. *Chemico-Biological Interactions*. 2019, 297, pp. 67-69.
- Tarloff, J. B. and Lash, L. M. 2004.** *Toxicology of the kidney*. s.l. : Chemical Rubber Company Press, 2004. ISBN: 978-0415248648.
- Thompson, James M. 2017.** *Mass Spectrometry*. s.l. : Pan Stanford Publishing, 2017. pp. 1-20. ISBN: 978-1-351-20715-7.
- Tozer, N. Thomas and Rowland, Malcolm. 2016.** *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. s.l. : Wolters Kluwer, 2016. pp. 17-30. ISBN: 9781451194425.
- Villaça-Abreu, Yael and Levin D., Edward. 2019.** Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. *Environment International*. 2019, 99, pp. 55-77.
- Visser, Marike. 2018.** Translating Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data into Practice. *Vet Clin Exot Anim*. 2018, 21, pp. 169-182.
- Vital de Oliveira, Osmair, Cuya, Teobaldo and Ferreira, Correa, Ernesto, Gonçalves, Arlan da Silva. 2018.** Theoretical investigations of Human

Acetylcholinesterase inhibition efficiency by neurotoxic organophosphorus compounds. *Chemical Physics Letters*. 2018, 706, pp. 82-86.

Vitola, G., et al. 2019. Biocatalytic membrane reactor development for organophosphates. *Journal of Hazardous Materials*. 2019, 365, pp. 789-795.

Voicu, Victor A., et al. 2010. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of consequences: a critical review. *Journal of Applied Toxicology*. 2010, 30, pp. 719-729.

Wei, Zhao, et al. 2014. New efficient imidazolium aldoxime reactivators for nerve agent-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014, 24, pp. 5743-5748.

Wikiwand. 2013. Medical gallery of Blousen Medical. *Wikiwand*. [Online] WikiJournal of Medicine, 28. 08 2013. [Cited: 03. 04 2019.] http://www.wikiwand.com/en/Substantia_nigra.

Wilkinson, Jonathan N., Moppett, Iain K. and Hardman, Jonathan G. 2008. Modes of drug elimination. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2008, 8, pp. 362-365.

Worek, Franz and Thiermann, Horst. 2013. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacology & Therapeutics*. 2013, 139, pp. 249-259.

Worek, Franz, Thiermann, Horst and Wille, Timo. 2016. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chemico-Biological Interactions*. 2016, 259, pp. 93-98.

XenoSite. XenoSite. [Online] Washington University in St. Louis, School of Medicine. [Cited: 05 03, 2019.] http://swami.wustl.edu/xenosite/?fbclid=IwAR1GbO9s6_qh1P6vsPAI-5t3Igzk9g0EucLSXL_xZOeHMLBOTj6pSP4AQU8.

Yang, Song, Sadilek, Martin and Lidstrom, Mary E. 2010. Streamlined pentafluorophenylpropyl column liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry and global ¹³C-labeled internal standards improve performance for quantitative metabolomics in bacteria. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217, pp. 7401-7410.

Yang, Y., et al. 2016. Oral Drug Absorption: Evaluation and Prediction. [book auth.] Yihong Qiu, et al. *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*. s.l. : Elsevier, 2016, pp. 331-354.

- Zhou, Fengbo, Zhu, Hongqiu and Li, Changgeng. 2019.** A pretreatment method based on wavelet transform for quantitative analysis of UV-vis spectroscopy. *Optik-International Journal for Light and Electron Optics*. 2019, 182, pp. 786-792.
- Zhou, Honghui and Theil, Frank-Peter. 2016.** *ADME and Translational Pharmacokinetics/Pharmacodynamics of Therapeutic Proteins*. s.l. : Wiley, 2016. ISBN: 978-1-118-89864-2.
- Žďárová Karasová, Jana, et al. 2014.** Entry of oxime K027 into the different parts of rat brain: Comparison with obidoxime and oxime HI-6. *Journal of Applied Biomedicine*. 2014, 12, pp. 25-29.
- Žďárová Karasová, Jana, et al. 2010.** Passive diffusion of acetylcholinesterase oxime reactivators through the blood–brain barrier: Influence of molecular structure. *Toxicology in Vitro*. 2010, 24, pp. 1838-1844.
- Žďárová Karasová, Jana, et al. 2017.** Pharmacokinetic profile of promising acetylcholinesterase reactivators K027 and K203 in experimental pigs. *Toxicological Letters*. 2017, 273, pp. 20-25.
- Žďárová Karasová, Jana, et al. 2012.** Pharmacokinetics of acetylcholinesterase reactivator K203 and consequent evaluation of low molecular weight antioxidants/markers of oxidative stress. *Journal of Applied Biomedicine*. 2012, 10, pp. 71-78.
- Žďárová Karasová, Jana, Stodůlka, Petr and Kuča, Kamil. 2010.** In vitro screening of blood-brain barrier penetration of clinically used acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Applied Biomedicine*. 2010, 8, pp. 35-40.