

**Univerzita Palackého v Olomouci**

# **Diplomová práce**

**Olomouc 2024**

**Bc. Kateřina Křištofová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**ADME jako podpora k objevování nových léčiv  
v rámci preklinického vývoje**

**Diplomová práce**

**Bc. Kateřina Křištofová**

Studijní program: biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2024**

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

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Akademický rok: 2022/2023

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina KŘIŠTOFOVÁ**  
Osobní číslo: **R220032**  
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**  
Téma práce: **ADME jako podpora k objevování nových léčiv v rámci preklinického vývoje.**  
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

### Zásady pro vypracování

Zásady pro vypracování:

1. Cílem práce je seznámit se s ADME (absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování) vlastnostmi studovaných látek neboli určit stabilitu a permeabilitu studovaných látek.
2. V rámci teoretické části práce bude vypracována rešerše zaměřená na téma bakalářské práce.
3. Praktická část bude obsahovat metody stanovující např. chemickou, plasmatickou a mikrosomální stabilitu, dále pak model pasivní difúze a určení vazby na plasmatické proteiny.
4. Otestování látek (potenciálních léčiv) danými metodami a shrnutí výsledků.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Fan J., De Lannoy I.A. Pharmacokinetics. *Biochem Pharmacol.* 2014; 87:93-120.
- [2] Vrbanac J., Slaughter R. ADME in drug discovery. *A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development.* 2013 by Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387815-1.00002-2>
- [3] Brooke M. Rock and Robert S. Foti. Pharmacokinetic and Drug Metabolism Properties of Novel Therapeutic Modalities. *Drug Metabolism and Disposition* October 2019, 47 (10) 1097-1099
- [4] Smith DA, Di L, Kerns EH. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9:929-39.
- [5] Nassar AF, Hollenberg PF, Scatina J. *Drug metabolism handbook: concepts and applications.* Hoboken NJ: Wiley. 2009; 9780470118030.
- [6] van Liempd S, Morrison D, Sysmans L, Nelis P, Mortishir-Smith R. Development and validation of a higher-throughput equilibrium dialysis assay for plasma protein binding. *J Lab Autom.* 2011; 16(1):56-67.

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Barbora Lišková, Ph.D.**  
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 29. října 2022  
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

LS.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 3. listopadu 2022



### **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Křištofová
Název práce	ADME jako podpora k objevování nových léčiv v rámci preklinického vývoje
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce	Mgr. Barbora Lišková, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2024
Klíčová slova	farmakokinetika, triterpeny, ADME, hmotnostní spektrometr, RapidFire
Počet stran	64
Jazyk	čeština

### **Souhrn:**

Tato diplomová práce se zabývá studiem farmakologických vlastností v rámci preklinického vývoje kandidátních léčiv derivátů triterpenů. Triterpeny jsou důležité z hlediska svých rozličných biologických a cytotoxických aktivit, mezi které řadíme zejména pro nás nejzajímavější protinádorový účinek. Experimentální část obsahuje testování stabilit (chemická, plazmatická a mikrosomální) charakterizující ADME – fáze absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování za použití *in vitro* metod. Dále byla testována vazba léčiv na plazmatické proteiny (RED test – Rapid equilibrium dialysis), kdy bylo stanoveno procento vázané frakce. V neposlední řadě byla studována permeabilita látek přes uměle vytvořenou polopropustnou membránu za využití *in vitro* nebuněčného modelu pasivní difúze PAMPA (Parallel artificial membrane permeability assay).

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname:	Bc. Kateřina Křištofová
Title:	ADME as support for the discovery of new drugs in preclinical development.
Type of thesis	master
Department	Department of cell biology and genetics
Supervisor	Mgr. Barbora Lišková, Ph. D.
The year of presentation	2024
Keywords	pharmacokinetic, ADME, triterpenes, RapidFire, mass spectrometry
Number of pages	64
Language	czech

**Summary:**

This thesis deals with the study of pharmacological properties in the preclinical development of candidate drugs of triterpene derivatives. Triterpenes are important in terms of their various biological and cytotoxic activities, among which the most interesting for us is the anti-cancer effect. The experimental part includes the testing of the stabilities (chemical, plasma and microsomal) characterizing the ADME – phases of absorption, distribution, metabolism and excretion using *in vitro* methods. In addition, the binding of drugs to plasma proteins (RED test – Rapid equilibrium dialysis) was tested by determining their percentage of bound fraction. Finally, the permeability of substances across an artificial semi-permeable membrane was studied using the *in vitro* non-cellular passive diffusion model PAMPA (Parallel artificial membrane permeability assay).

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně za pomoci uvedených literárních zdrojů pod vedením Mgr. Barbory Liškové, Ph. D.

V Olomouci dne .....

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych chtěla poděkovat mé vedoucí diplomové práce Mgr. Barboře Liškové, Ph.D. za odborné vedení, pomoc při práci v laboratoři, věnovaný čas při opravování této práce a ochotu zodpovědět veškeré otázky. Mé poděkování také patří mé rodině a nejbližším za podporu během mého celého studia.

# OBSAH

<b>1 Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Cíle práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární přehled .....</b>	<b>3</b>
3. 1 Farmakologie .....	3
3. 1. 1 Farmakokinetika .....	4
3. 1. 1. 1 Absorpce látek.....	8
3. 1. 1. 2 Distribuce látek.....	9
3. 1. 1. 3 Metabolismus látek.....	10
3. 1. 1. 4 Exkrece látek.....	13
3. 2 Léčiva .....	15
3. 2. 1 Triterpeny .....	15
3. 3 Hmotnostní spektrometrie .....	18
3. 3. 1 Hmotnostní analyzátoři .....	19
3. 3. 1. 1 Kvadrupólový analyzátoř.....	20
3. 3. 2 Ionizační techniky .....	21
3. 3. 2. 1 Ionizace elektrosprejem .....	22
3. 4 Solid phase extraction (SPE) .....	24
3. 4. 1 RapidFire.....	25
<b>4 Materiál a metody .....</b>	<b>28</b>
4. 1 Použitý materiál .....	28
4. 1. 1 Biologický materiál .....	28
4. 1. 2 Použité chemikálie .....	28
4. 1. 3 Přístroje a zařízení .....	29
4. 2 Metodika .....	30
4. 2. 1 Chemická stabilita.....	31
4. 2. 2 Plazmatická stabilita .....	31
4. 2. 3 Mikrosomální stabilita.....	32
4. 2. 4 Vazba na proteiny .....	33
4. 2. 5 Metoda PAMPA .....	34

4. 2. 6 Analýza vzorků za pomoci RF – MS/MS.....	36
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>38</b>
<b>6 Diskuse .....</b>	<b>43</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>47</b>
<b>8 Použitá literatura .....</b>	<b>48</b>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

**Obrázek 1** – Schéma procesů farmakokinetiky (ADME)

**Obrázek 2** – Výpočet distribučního objemu

**Obrázek 3** – Výpočet clearance

**Obrázek 4** – Výpočet biologického poločasu eliminace

**Obrázek 5** – Profil plazmatické koncentrace u intravenózního a ústního podání

**Obrázek 6** – Chemická struktura porfyrinového kruhu cytochromu P450 s centrálním atomem Fe

**Obrázek 7** – Struktura isoprenu

**Obrázek 8** – Zástupci nejvýznamnějších derivátů triterpenů (kyselina oleanolová, lupeol, kyselina ursolová)

**Obrázek 9** – Schéma hmotnostního spektrometru

**Obrázek 10** – Schéma kvadrupólového analyzátoru

**Obrázek 11** – Mechanismus ionizace elektrosprejem

**Obrázek 12** – Schéma metody extrakce na pevné fázi (SPE)

**Obrázek 13** – RapidFire typu RF400 firmy Agilent Technologies

**Obrázek 14** – Postup extrakce analyzovaného vzorku za pomoci systému RapidFire

**Obrázek 15** – Interakce molekul léčiva s plazmatickým proteinem albuminem

**Obrázek 16** – Princip RED testu

**Obrázek 17** – Vzorec pro vypočítání vazby na plazmatické proteiny

**Obrázek 18** – Schéma modelu PAMPA

**Obrázek 19** – Výpočet koeficientu propustnosti Papp

**Obrázek 20** – Vzorec pro výpočet vnitřního clearance

## SEZNAM TABULEK

**Tabulka 1** – Výstupní parametry stanovené hmotnostním spektrometrem při detekci studovaných triterpenů LEM00018315, LEM00129909 a LEM00129910

**Tabulka 2** – Nalezené MS/MS přechody stanovené hmotnostním spektrometrem u jednotlivých studovaných triterpenů

**Tabulka 3** – Výsledná data o procentu vázané frakce testovaných triterpenů za pomoci RED testu

**Tabulka 4** – Výsledná relativní permeabilita u studovaných látek triterpenů zjištěna za pomoci metody PAMPA a následné zařazení do kategorie propustnosti

**Tabulka 5** – Kompletní data pro látku LEM00129909 získané při analýze plazmatické stability

**Tabulka 6** – Kompletní výsledky ADME testování u studovaných kandidátních triterpenů

## SEZNAM GRAFŮ

**Graf 1** – Chemická stabilita studovaných triterpenů LEM00018315, LEM00129909 a LEM00129910 – závislost relativní koncentrace (%) triterpenů na době inkubace (min) ve fosfátovém pufru

**Graf 2** – Plazmatická stabilita studovaných triterpenů LEM00018315, LEM00129909 a LEM00129910 – závislost relativní koncentrace (%) triterpenů na době inkubace (min) ve 100% lidské plazmě

**Graf 3** – Mikrosomální stabilita studovaných triterpenů LEM00018315, LEM00129909 a LEM00129910 – závislost relativní koncentrace (%) triterpenů na době inkubace (min) za přítomnosti lidských jaterních mikrosomů



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>ADME</b>	Absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece
<b>C18</b>	HPLC kolona s reverzní fází C18
<b>Caco-2</b>	Buněčná linie odvozená z lidského adenokarcinomu tlustého střeva
<b>CE</b>	Kolizní energie
<b>CI</b>	Chemická ionizace
<b>C<sub>int</sub></b>	Vnitřní clearance
<b>Cl</b>	Celková clearance
<b>CNS</b>	Centrální nervová soustava
<b>CXP</b>	Výstupní potenciál kolizní cely
<b>CYP</b>	Enzymy cytochromu P450
<b>CYP3A4</b>	Cytochrom P450 3A4
<b>CYP450</b>	Enzymy cytochromu P450
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Deoxyribonukleová kyselina
<b>DP</b>	Deklasterizační potenciál
<b>EI</b>	Elektronová ionizace
<b>ESI</b>	Ionizace elektrosprejem
<b>FDA</b>	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (U. S. Food and drugs administration)
<b>fu</b>	Množství volné frakce látky
<b>GC – MS/MS</b>	Plynová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
<b>GC-MS</b>	Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
<b>GIT</b>	Gastro intersticiální trakt
<b>HPLC</b>	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
<b>IS</b>	Interní standard
<b>LC-MS/MS</b>	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
<b>m/z</b>	Poměr hmotnosti k náboji

<b>MALDI</b>	Ionizace laserem za účasti matrice
<b>MeOH</b>	Methanol
<b>MRM</b>	Sledování produktu rozpadu molekulového iontu (Multiple reaction monitoring)
<b>MS</b>	Hmotnostní spektrometrie
<b>MS/MS</b>	Tandemová hmotnostní spektrometrie
<b>NADP</b>	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
<b>NADPH</b>	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát redukována forma
<b>PAMPA</b>	Parallel artificial membrane permeability assay – <i>in vitro</i> model pasivní difúze
<b>Papp</b>	Relativní permeabilita látek
<b>PBS</b>	Fosfátový pufr
<b>pK<sub>A</sub></b>	Disociační konstanta kyseliny K <sub>A</sub>
<b>RED test</b>	Rapid equilibrium dialysis – test rychlé rovnovážné dialýzy
<b>RF</b>	RapidFire
<b>RF-MS/MS</b>	RapidFire ve spojení s tandemovou hmotností spektrometrií
<b>rpm</b>	otáčky za minutu
<b>SIM</b>	Single ion monitoring
<b>SPE</b>	Extrakce na pevné fázi
<b>T<sub>1/2</sub></b>	biologický poločas
<b>TOF</b>	Analyzátor doby letu
<b>UGT</b>	Uridin-5-difosfát-glukuronosyltransferázy
<b>UMTM</b>	Ústav molekulární a translační medicíny v Olomouci
<b>V<sub>d</sub></b>	distribuční objem

# 1 Úvod

Farmakokinetické procesy, mezi které řadíme absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování, jsou velmi podstatné v preklinickém vývoji a testování nových kandidátních léčiv. Snahou je analyzovat, jak se daná struktura zachová v organismu v průběhu jednotlivých ADME procesů a také identifikovat jejich potenciální nežádoucí vlastnosti. Nicméně mnoho z takto analyzujících látek nedokáže projít přes preklinické testování do další fáze z důvodu například jejich vysoké toxicity či nedostatečnému biologickému účinku. Pokud látka, která má snahu stát se léčivem, projde přes preklinické testování, nastupuje testování klinické. U tohoto testování jsou některé látky eliminovány. Pouze poměrně úzké spektrum testovaných kandidátních léčiv úspěšně projde jak preklinickým, tak klinickým testováním a jsou využita k terapeutickému použití jako léčiva pro rozličné choroby.

ADME procesy mezi které se řadí absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece popisují osud léčiva v organismu v čase po podání. Absorpce se označuje přechod léčiva z místa podání do krevní plazmy. Další fází je distribuce, kterou se označuje pohyb molekul látky v těle mezi krevním řečištěm, tělesnými tkáněmi nebo orgány. Metabolismus látek je proces chemické změny struktury látky v těle na jeho metabolity, tzv. biotransformace. Poslední fází je exkrece, která spočívá ve vyloučení látky společně s jejími metabolity vzniklé biotransformací.

V rámci této diplomové práce byly využity kandidátní léčiva patřící do skupiny triterpenů. Triterpeny se řadí mezi přírodní sloučeniny nacházející se především v rostlinách či ovoci. Triterpenům jsou připisovány protizánětlivé účinky. Dalším potenciálním terapeutickým použitím je u různých typů rakovin. Mezi triterpeny můžeme zařadit kyselinu oleanolovou, boswellovou či ursolovou. Tyto kyseliny dokážou inhibovat nádorový růst při studiu na myších modelech.

## 2 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je v rámci teoretické práce popsání farmakokinetika v preklinickém vývoji léčiv a popsání metod využitých při tomto procesu (hmotnostní spektrometrie a jeho spojení se systémem RapidFire). Dále je rozebírán pohled na problematiku propustnosti látek přes uměle vytvořenou membránu. V rámci experimentální části jsou analyzovány tři látky, které patří mezi kandidáty na nová léčiva. Tyto látky patří do skupiny triterpenů. Cílem je vyhodnocení jejich ADME vlastností v rámci preklinického vývoje. V této práci jsou aplikovány různé metody, mezi které můžeme zařadit *in vitro* metody analyzující stabilitu studovaných triterpenů – chemická stabilita ve fosfátovém pufru, plazmatická stabilita ve 100 % plazmě, mikrosomální stabilita v přítomnosti jaterních mikrosomů a vazbu látek na plazmatické proteiny.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Farmakologie

Farmakologii definujeme jako studium léčiv, která interagují s živými organismy, orgány či tkáněmi prostřednictvím chemických procesů. Mezi tyto interakce můžeme zařadit zejména vazbu na regulační molekuly a následnou aktivaci či inaktivaci tělesných procesů. Léčivo je chemická látka o známé struktuře, která při podání může vyvolat biologickou odpověď. Tyto chemické látky mohou být jak prospěšné, tak i škodlivé pro organismy (Bertram G. Katzung, 2004). Cílem farmakologie je poskytování vědeckých dat, díky kterým lze vybrat vhodnou léčbu, která bude mít prokázanou terapeutickou účinnost a zejména bude bezpečná pro daného pacienta. Další specifitou je hledání nových léčiv. Prvotně jsou látky zkoumány preklinicky (experimentální farmakologie), následně pak u člověka (klinická farmakologie). S farmakologií úzce souvisí obor toxikologie, který se zabývá nežádoucími účinky různých chemických látek na živé systémy. Všechny látky mohou být za určitých okolností toxické. To zahrnuje znalost povahy a účinků různých jedů, detekci a také léčbu otrav, jelikož mnoho léků může ve vysokých dávkách působit jako jed (Satoskar *et al.*, 2020). Interakce mezi studovanou látkou a živým systémem lze rozdělit do dvou základních okruhů farmakologie – farmakodynamika a farmakokinetika. Farmakodynamikou označujeme účinky léčiva na studovaný organismus. Farmakokinetické procesy pak poukazují na účinky organismu na léčivo.

Farmakodynamika zahrnuje fyziologické a biochemické účinky léčiv a mechanismus jejich účinků na organismus. Zaujímá tedy vztah mezi dávkou a účinkem daného léčiva. Účinná látka putuje k cílové buňce, kde se specificky váže na vazebné místo selektivních proteinových molekul, které ji rozeznávají. Selektivními molekulami označujeme receptory. Pokud látka aktivuje receptor, pak se spouští procesy zprostředkující buněčnou odpověď, později tkáňovou a systémovou odpověď (Martínková *et al.*, 2018). U farmakodynamických procesů se musí většina léčiv vázat na receptor, aby byl vyvolán účinek. Farmakodynamika se také zajímá studiem účinků léčiv na patogenní mikroorganismy. V praxi farmakodynamika hodnotí účinky léčiv z kvantitativního hlediska.

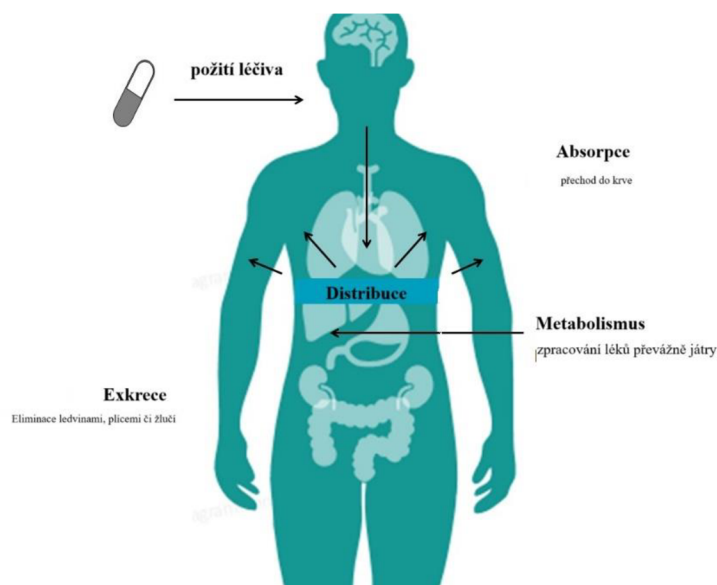
Farmakokinetika se zabývá popisem pohybu léčiv v časovém intervalu a změn týkajícím se místem podáním léčiv a zpracovávání matematických modelů. Látka po

podání putuje v těle různými systémy – krví, prostupuje do tkání a je eliminována v orgánech. Základními ději farmakokinetiky jsou absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece. Tyto děje se souhrnně nazývají jako ADME. V praxi farmakokinetika posuzuje časový průběh účinku léčiva a stanovuje vhodnou koncentraci a dávkování léčiva. V neposlední řadě je základem pro vývoj nových léčiv (Satoskar *et al.*, 2020).

Farmakologii lze zařadit mezi nejstarší vědní obory. Toxické nebo prospěšné účinky rozeznávali už lidé v pravěku. Nicméně první poznatky o farmakologii sahají do období středověku. V 17. století se rozvíjela věda o přípravě léčiv a lékařské použití drog, tzv. *materia medica*. První ústav zabývající se farmakologií byl založen v roce 1847 německým lékařem Rudolfem Buchheim. Později na konci 19. století byli navrženy některé základní koncepty farmakologie Oswaldem Schmiedebergem společně s jeho studenty. Oswald Schmiedeberg je dnes považován za otce farmakologie (Tripathi, 2013).

### **3. 1. 1 Farmakokinetika**

Farmakokinetika se zabývá otázkou „Co organismus udělá s léčivem?“. Popisuje osud léčiva v organismu v čase po podání. Zahrnuje fáze absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece léčiv, souhrnně ADME (Obr.1). Tyto procesy jsou klíčovými faktory časového průběhu působení léčiv v různých částech těla, a také časového průběhu účinku léčiva po podání. Pro farmakokinetiku je důležitý popis chování léčiv za pomoci matematických rovnic. Ty jsou důležité pro pochopení různých farmakokinetických procesů. Farmakokinetika se uplatňuje ve všech fázích při vývoji léčiv. Studujeme jejich chování u různých druhů zvířat, které lze následně využít k předpokladu ADME u lidí. Stejně tak se využívá k navrhování a přípravě vhodného dávkování léčiv pro použití v preklinickém a klinickém vývoji léku (Hedaya *et al.*, 2012).



**Obrázek 1-** Schéma procesů farmakokinetiky (ADME); převzato z <https://g2c5z3j6.rocketcdn.me/image/ADME-pharmacokinetics-studies-assays.jpg>, upraveno

K vyvolání odpovědi na léčivo je důležité, aby se daná látka dostala do blízkosti receptorů. Když je lék podáván přímo do krve musí se nejprve absorbovat z místa podání a až poté je transportován buď volný, vázaný na plazmatických proteinech anebo krevními buňkami. Léčivo přítomné ve volné formě podléhá distribuci a vstupuje do cílových orgánů. V orgánech se léčivo vyskytuje jak ve volné formě (rozpuštěno v extracelulární nebo intracelulární tekutině) tak ve vázané formě. Léčivo se posléze váže na příslušné farmakologické receptory, čímž může vyvolat odpověď. Pokud je léčivo dlouhodobě vázáno na receptor a váže se významné množství léčiva, označujeme tuto vazbu jako depotní. Tato vazba může prodloužit pobyt léčiva v těle. Příkladem depotní vazby může být arsen vázaný ve vlasech. V játrech, ledvinách, střevě či v plicích může léčivo být metabolicky přeměněno procesem tzv. biotransformace. Tyto metabolity se pak nacházejí volné nebo vázané v plazmě, krvi nebo v tkáních. Eliminací se poté označuje metabolická přeměna látek na neúčinné produkty a jejich následná exkrece (Martínková *et al.*, 2007).

Farmakokinetickými parametry popisují závislosti koncentrace léčiva na podání za pomoci matematických vztahů jsou distribuční objem, celková clearance, biologický poločas eliminace a další. Distribuci v těle popisuje veličina distribuční objem  $V_d$ . Distribuční objem nám udává poměr mezi podanou dávkou léčiva a jeho plazmatickou

koncentrací, jehož jednotkou jsou litry (L) (Obr.2). Lze ho také definovat jako celkový objem léčiva, které muselo být rozptýlené v těle, aby byla dosáhnuta stejná koncentrace léčiva jako je v plazmě. Nicméně se léčivo rozptyluje nerovnoměrně, a proto je distribuční objem pouze zdánlivým objemem, ve kterém by se dávka léčiva v těle musela distribuovat homogenně, aby koncentrace léčiva byla stejná jako v krvi. Vysoké naměřené hodnoty  $V_d$  poukazují na distribuci účinné látky do intracelulárního prostoru (léčiva s vysokou rozpustností) na rozdíl od nižších hodnot stanovující setrvání léčiva v extracelulárním prostoru a vysoké koncentrace v krvi (léčiva s nízkou rozpustností) (Slíva a Votava, 2011).

$$V_d = \frac{\text{množství léčiva v těle}}{c} [L]$$

**Obrázek 2** - Výpočet distribučního objemu; legenda:  $V_d$  – distribuční objem,  $c$  – koncentrace léčiva v krvi či v plazmě

Clearancí se udává objem biologické tekutiny, která byla kompletně očištěna od sledovaného léku za jednotku času. Většinou se udává renální či jaterní clearance, která stanovuje množství biologické tekutiny očištěné od léčiva pomocí ledvin/jater za jednotku času. Pokud sečteme všechny tkáňové clearance dostaneme hodnotu celkové clearance. Clearance nám neudává, jaké množství látky bude metabolizováno, ale kolik bude eliminováno z organismů (z orgánů). Clearance je tedy velmi důležitou konstantou v případě správného dlouhodobého dávkovacího režimu. Jednotkou clearance je objem, který je vztažen na jednotku času např. l/h či ml/s. Clearance matematicky vyjádříme jako podíl rychlosti eliminací léčiva a jeho koncentrací v plazmě či v krvi (obr.3).

$$Cl = \frac{\text{rychlost eliminace}}{c} [l/h; ml/s]$$

**Obrázek 3** – Výpočet clearance; legenda:  $Cl$  – clearance,  $c$  – koncentrace léčiva

Další konstantou je biologický poločas eliminace ( $t_{1/2}$ ), který stanovuje dobu, která je potřebná ke snížení koncentrace léčiva v plazmě na polovinu od počáteční hodnoty a je



definován jednotkou času (hodina, minuta či den) (obr.4). Biologický poločas eliminace je z pohledu matematiky lineární, avšak v praxi se léčivo vyloučí za 4-5 biologických poločasů. Tento parametr je velmi důležitý ke stanovení správného dávkování u opakujícím se podání či u infuzí.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_e} [h; min; den]$$

**Obrázek 4** – Výpočet biologického poločasu eliminace; legenda:  $t_{1/2}$  – poločas rozpadu látky,  $k_e$  – eliminační konstanta

Farmakokinetika zahrnuje modely, díky nimž dokážeme popsat pravděpodobné chování léku v organismu za pomoci matematických výpočtů, které zahrnují farmakokinetické parametry (Mohsen A. Hedaya *et al.*, 2012). Nejjednodušším modelem, kterým lze popsat distribuci léčiva v těle je jednokompartmentový, kde se považuje celé tělo jako jeden kompartment. U tohoto modelu je podstatné jeho rozdělení, zda je dané léčivo podáváno intravenózně či extravaskulárně. V případě intravenózního podání odpadá fáze absorpce na rozdíl od extravaskulárního, kde je absorpce součástí. Jednokompartmentový model se využívá k popisu látky, která se rychle, rovnoměrně distribuuje a následně je eliminována. Nicméně nelze očekávat, že léčivo bude v těle rovnoměrně rozptýleno, a proto musíme brát v potaz nepřesnost matematických výpočtů. Tento typ modelu je však důležitý k vyhodnocení a predikci pohybu látky v časovém intervalu po jejím podání. Dalším modelem je dvoukompartmentový, který charakterizuje výměnu látek mezi dvěma kompartmenty, centrálním a periferním, s cílem zachování rovnováhy. Centrální kompartment zahrnuje krev a poté silně prokrvené orgány mezi které řadíme srdce, játra, ledviny a další. Naopak mezi periferní řadíme tukovou tkáň nebo kosterní svalstvo, tedy tkáň méně prokrvené. Dvoukompartmentový model je podstatný v případě zabýváním se vnitřní struktury jednotlivých kompartmentů (Burtis *et al.*, 2006; Dostálek *et al.*, 2006).

Pro absorpci léčiva a jeho následný transport je důležité znát jeho fyzikální a chemické vlastnosti, mezi které patří velikost léčiva, tvar, rozpustnost ve vodě či v tucích atd. Léčivo je transportováno za pomoci aktivního transportu, pinocytózy, filtrací či, nejčastější pro léčiva rozpustná v tucích, pasivní difuzí. Lipofilita výrazně ovlivňuje rychlost absorpce, penetrace i eliminace. Pasivní difuze je mechanismus transportu, při

kterém je hnací silou rozdíl koncentrací léčiva na obou stranách membrány bez spotřeby energie ve formě ATP. Léčivo se může chovat jako slabá kyselina či zásada, kdy velmi záleží na pH prostředí a  $pK_A$  (disociační konstanta) (Trejtnar, 2016). Farmakokinetika se využívá zejména k monitorování koncentrace v průběhu terapie, měření farmakokinetických parametrů. Také se používá k predikci koncentrace léčiva v organismu a lékových interakcí (Lincová, 2007).

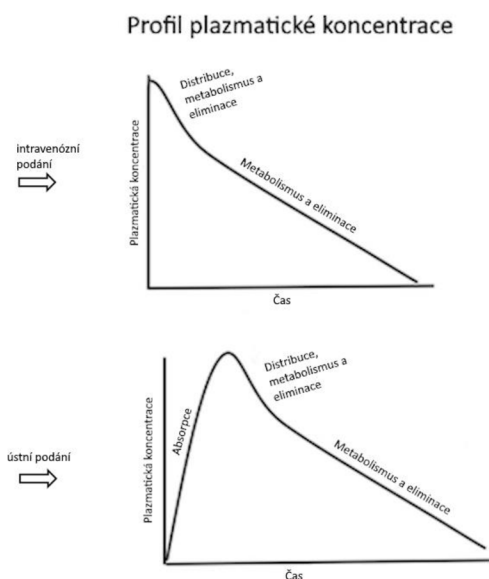
Farmakologie se zejména využívá k popsání časového průběhu právě u léku po podání. Nicméně ji můžeme aplikovat společně s jejími principy na jakoukoliv sloučeninu (hormon, toxin, pesticid, živiny a další), která se absorbuje do těla (Mohsen A. Hedaya *et al.*, 2012).

### **3. 1. 1. 1. Absorpce látek**

Přechod léčiva z místa podání do krevní plazmy se označuje jako absorpce. Rychlost absorpce závisí na místě a také cestě podání léčiva. Musíme zvážit absorpční plochu, například u tenkého střeva dojde k větší rychlosti absorpce nežli v žaludku z důvodu větší absorpční plochy. Rychlost absorpce je velmi důležitý aspekt při zkoumání léčiv, jelikož rychlé vstřebávání léku vede k rychlému nástupu účinků. Tato vlastnost je základním požadavkem při podání v akutních situacích. Avšak u některých onemocnění je vhodnější pomalá absorpce, jako například hypertenze či diabetes, jelikož zde dochází k malému kolísání koncentrace léčiva v krvi při pomalé absorpci (Mohsen A. Hedaya *et al.*, 2012). Dále rozhoduje taktéž prokrvení místa absorpce nebo patofyziologické změny při nemoci, mezi které řadíme například průjmy a zvracení. V neposlední řadě je důležitá také léková forma. Pokud je podání intravenózní nebo intraarteriální nehovoříme zde přímo o absorpci.

Existuje mnoho způsobů podání léčiva. Léčivo se může aplikovat lokálně, například aplikací na kůži či sliznici očí a nosu. Lokální podání je určeno pro místní účinek. Patří zde emulze, masti či roztoky. Dalším způsobem podání léčiva je celkové podání, které je určeno pro systémové účinky. Tento způsob je určen rychlostí absorpce, a také podanou dávkou léčiva. Celkové podání dělíme dále podle místa vstupu, kde můžeme zahrnout enterální nebo parentální. Enterální vstup neboli přímo do trávicí soustavy, zahrnuje nejčastější perorální vstup a perrektální (vstup konečníkem). Perorální vstup neboli podání ústy je přirozenou cestou vstupu léčiva a zde je absorpce určena z GIT nebo z dutiny ústní do krve. V případě GIT se projevení léčiva, které jsou v podobě

například tablety, pohybuje přibližně 30 min po podání. V případě parentálního se jedná o vstup, které obcházejí trávicí systém. Do této skupiny zařazujeme například intravenózní, intraarteriální, intramuskulární či inhalační podání. Při intravenózním a intraarteriálním podání celá dávka léčiva se dostává z místa podání do oběhu, a tedy fáze absorpce chybí (Obr.5). U intramuskulárního podání se léčivo přivádí do svalů, kde se vstřebává do krevního oběhu. Inhalační podání se využívá jak pro systémový, tak i pro místní účinek (účinek na bronchy). Rychlost absorpce u inhalačního podání je velmi rychlá a absorpční plochou je výstelka plicních alveolů (Martínková *et al.*, 2018). Absorpce je ovlivněna fyzikálními a chemickými vlastnostmi, rozpustností a koncentrací léčiv, průtokem krve, velikostí absorpčního povrchu a lokálními podmínkami.



**Obrázek 5** - Profil plazmatické koncentrace u intravenózního a ústního podání, převzato ze Sharma *et al.*, 2021, upraveno

### 3. 1. 1. 2. Distribuce látek

Distribucí se označuje pohyb molekul léčiva v těle mezi krevním řečištěm a tělesnými tkáněmi či orgány. Tento transport označujeme jako oboustranný, léčivo se tedy může pohybovat z krve do tkání a zpět. U distribuce nás zajímá, s jakou rychlostí je léčivo distribuováno do tkání a orgánů, tzv. dynamický děj. Dalším důležitým aspektem pro hodnocení distribuce je rozsah daný koncentracemi nenavázaného neboli volného

léčiva v částech těla (Martínková *et al.*, 2018). Oba tyto děje jsou závislé na fyzikálně-chemických vlastnostech, které ovlivňují, jak je léčivo schopné překonávat bariéry a poté vazby v krvi a v tkáních (Švihovec *et al.*, 2018). Hematoencefalická bariéra má významný podíl v distribuci léčiv v těle, kdy dochází k transportu látek z krve do CNS pomocí zejména pasivní difúze (látky lipofilního charakteru) a aktivního transportu (Martínková *et al.*, 2007).

Rychlost distribuce ovlivňuje nástup účinku léku a intenzita účinku stanovuje rozsah distribuce. Některé léčiva proti rakovině jsou distribuovány v dostatečném množství do příslušné tkáně, aby bylo dosaženo účinku tohoto léčiva. Dalšími aspekty, které ovlivňují rychlost distribuce jsou permeabilita membrány a perfuse orgánů. V případě dobře perfundovaných orgánech dochází k nárustu koncentrací léčiva, a to dříve, než je tomu v méně perfundovaných orgánech. Mezi takto dobře perfundované orgány řadíme mozek, srdce, ledviny, játra či plíce.

V případě lékové interakce dochází při působení určitých mechanismů ke změnám distribuce. K těmto mechanismům patří kompetice o vazbu na plazmatické bílkoviny a vytěsnění z vazebných míst. Mnoho léčiv, které jsou charakteristické jako slabé kyseliny se váží na plazmatickou bílkovinu albumin. Když se tyto léčiva váží na stejnou bílkovinu, se stejným vazebným místem, dochází ke kompetici a následnému vytěsnění. Tím se zvýší koncentrace volného nenavázaného léčiva v plazmě a také k vyšší účinnosti léčiva. Vysoká vazba léku na plazmatické bílkoviny je obvykle nežádoucí, jelikož může zpomalovat a omezovat distribuci léčiva v těle. Také tato vazba oddaluje a snižuje celkový účinek podaného léčiva (Součková *et al.*, 2023; Sliva a Votava, 2011). Dále je důležitá afinita léčiva k vazbě, kdy léčivo může být snadno vytěsněno z vazby i v případě vysokému rozsahu vazebnosti léčiva, jako je tomu v případě léčiva warfarin.

### **3. 1. 1. 3. Metabolismus látek**

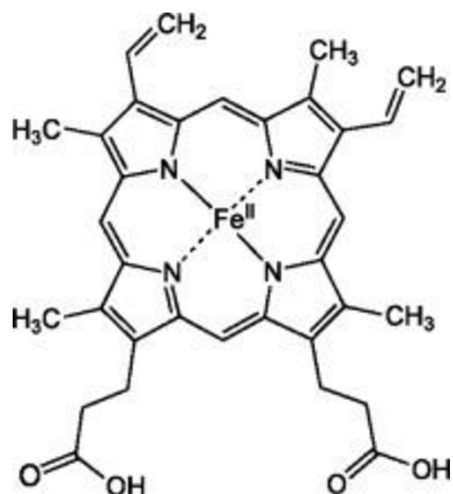
Metabolismem látek se rozumí proces, při kterém se chemicky změní struktura látky v těle na metabolity, aby bylo tělo zbaveno endogenních a absorbovaných exogenních látek tzv. biodegradací. Tento děj se odehrává v játrech, gastrointestinálním traktu, ledvinách, plicích, avšak v případě polycyklických aromatických uhlovodíků může

k přeměně dojít už i v dutině ústní. Přeměna struktury látky vede k aktivaci neúčinné podoby léku na účinnou či k inaktivaci, tedy eliminaci léku bez jeho účinku v těle. V případě aktivace látky až v místě účinku hovoříme o tzv. bioaktivaci, kde neúčinnou formu léčiva označujeme jako proléčivo (*prodrug*) (Součková *et al.*, 2023). Příkladem bioaktivace je přeměna kodeinu na morfin. Avšak může se stát, že účinná látka se bioaktivací přemění na toxickou, jako se tomu může stát v případě polycyklických aromatických uhlovodíků, které se mohou vázat na DNA a způsobit tak rakovinotvorné procesy nebo v případě nefrotoxických derivátů paracetamolu. Existují i léčiva, která nepodléhají metabolismu a následně se vylučují ve formě, která nepodlehla přeměně (Slíva a Votava, 2011).

U látek, které prochází metabolismem dochází ke zvýšení polariry z důvodu snížení distribuce a omezení reabsorpce látky v těle. Metabolismus (též biotransformace) můžeme rozdělit na dvě fáze. V I. fázi se setkáváme zejména s oxidačně-redukčními ději nebo hydrolýze za pomoci cytochromu P450 patřící k hemoproteinům, které vytváří či odhalují funkční skupiny. Ve II. fázi mluvíme o konjugaci zejména s kyselinou glukuronovou, hovoříme tedy o procesu glukuronidace.

V I. fázi biotransformace jsou nejdůležitějším prvkem enzymy, lokalizované v membráně hladkého endoplazmatického retikula, cytochromy P450. Tyto monooxygenázové enzymy patří k nejdůležitějším enzymatickým systémům katalyzující metabolismus látek (resp. xenobiotik). Cytochromy P450 (zkráceně CYP či P450s) obsahují porfyrinový kruh s centrálním atomem železa (Obr. 6), které má schopnost přecházet mezi stavy  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ . Přechod má za následek transfer elektronů, díky kterým cytochromy dokážou provádět oxidačně-redukční děje (Ingelman-Sundberg *et al.*, 2010). Cytochromy P450 dostaly svůj název, jelikož jejich maximální absorbance se pohybuje při 450 nm (Klingenberg, 1958). U CYP se můžeme setkat s řadou izoform, které jsou substrátově specifické. Některé izoformy však mají shodnou specifitu k substrátu, nicméně tento systém je ochranou před obrovskou škálou látek, které přicházejí do styku s lidským organismem. V současné době je identifikováno 57 genů, které kódují tyto izoformy cytochromů P450. P450s jsou rozdělovány do rodin dle homologie aminokyselinové sekvence, podrodin a na jednotlivé enzymy. U zástupců stejné rodiny počítáme se shodou více jak 40 % a značíme je arabskými číslicemi. Ke stejné podrodině řadíme ty, které mají homologii více jak 55 % a označujeme je velkými písmeny. Poměrná část dnes schválených léků společnosti FDA jsou metabolizována

prostřednictvím zejména CYP3A4, poté například CYP2D6, CYP2C9 a CYP1A1/2. CYP3A4 je hlavní formou nacházející se v lidských játrech a střevech (Simpson, 1997; Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).



**Obrázek 6** - Chemická struktura porfyrinového kruhu cytochromu P450 s centrálním atomem Fe, převzato z Cook *et al.*, 2016

Při oxidačních a redukčních dějích, za přítomnosti katalyzujících enzymů rodiny cytochromů P450, je atom kyslíku vkládán do substrátu. Vložením kyslíku vzniká ve struktuře látky polární funkční skupina, díky které se meziprodukt dané látky stává většinou více rozpustný ve vodě (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). Enzymy této rodiny mohou být indukovány (např. rifampicinem, ethanolem či karbamazepinem), ale také inhibovány (např. grapefruitovým džusem, fluoxetinem a cimetidinem). Proto musíme být obezřetní a vyvarovat se případným nežádoucím lékovým interakcím.

Do II. fázi vstupují látky změněné pomocí reakcí I. fáze biotransformace, které obsahují polární funkční skupiny. Za pomoci této funkční skupiny je k meziproductu konjugována endogenní látka za vzniku konjugátu. Konjugát je velmi polární látkou, která ztrácí schopnost reabsorpce. Mezi endogenní látky řadíme zbytky kyseliny glukoronové (tzv. glukoronidace), kyseliny sírové (sulfátová konjugace), glutathion, (glutathionová konjugace) a další. Pokud už podaná látka obsahuje ve své struktuře polární funkční skupinu podléhá přímo II. fázi biotransformace, jako je tomu v případě paracetamolu obsahující -OH skupinu. Látka je po tomto spojení rozpustná ve vodě a může být vyloučena z organismu. Mezi nejvýznamnější enzymy II. fáze biotransformace

můžeme zařadit UGT vázané v membránách. Enzymy UGT katalyzují spojení polární funkční skupiny se zbytkem kyseliny glukoronové za spotřeby energie. Tyto enzymy se rozdělují do 4 rodin, ale pouze 2 rodiny hrají roli v metabolismu léčiv u lidí (tzv. UGT1 a UGT2) (Švihovec *et al.*, 2018).

Během podání více léčiv zároveň je důležitá rychlost eliminace. U léčiva, které je eliminováno rychleji, je potřeba častějšího podání. Také musíme brát zřetel na funkci orgánů zodpovědných za vylučování léku. U pacientů s dysfunkcí ledvin musí být dávka, která bude eliminována ledvinami, upravena na nižší hodnoty. U pacientů s dysfunkcí jater musí být snížena dávka léku, které budou eliminovány přes jaterní metabolismus (Mohsen A. Kedaya *et al.*, 2012). Rychlost metabolismu může být ovlivněna genetickou variabilitou. Někteří lidé se mohou řadit mezi tzv. rychlé metabolizátory, tedy ty, kteří podané léky eliminují rychle. Naopak u pomalých metabolizátorů může docházet k nahromadění léku v těle společně s rizikem vedlejších účinků.

V souhrnu metabolismus látek má klíčový vliv na tom, jak dlouho léčivo setrvá v těle a jak silný je jeho účinek. Je tedy důležitou součástí eliminace (detoxikace) umožňující jednodušší exkreci polárnějších méně toxických metabolitů než původní látka. Poznání tohoto děje je důležitý zejména při stanovení správné dávky a minimalizaci jeho vedlejších účinků.

### **3. 1. 1. 4 Exkrece látek**

Exkrece (jinak vylučování) je proces, při kterém se organismus zbavuje látek a metabolitů biotransformace. I když je látka vyloučena, může v těle setrvávat jeho účinek, které v závislosti na metabolismu postupně odezní. Mezi hlavní orgány, které se účastní exkrece jsou ledviny, játra, plíce či mateřské mléko. Nicméně pro některé látky existují jiné způsoby exkrece. Tyto látky se vylučují prostřednictvím slin, slz, potu, jiné jako součást mateřského mléka (Martínková *et al.*, 2018). Nejlépe se vylučují látky polárního charakteru, naopak lipofilní látky se však vylučují poměrně pomalu. Exkreci dělíme na primární exkreci též exkreci renální, dále exkreci sekundární neboli extrarenální. Renální vylučování je spjato s vylučovacím orgánem ledvinami. Zde můžeme exkreci rozdělit na tři způsoby: glomerulární filtrace, aktivní tubulární sekrece a pasivní difuze skrze tubulární výstelku. Látky v ledvinách procházejí membránou glomerulu do primární moči tzv. filtrátu (Slíva a Votava, 2011). Přes kapiláry glomerulů lze transportovat léčivo volné

neboli nenavázané na plazmatické bílkoviny s molekulovou hmotností méně jak 60 kDa (Martínková *et al.*, 2018). Léčiva, jež jsou vylučována nezměněna nebo u kterých jsou vylučovány jeho aktivní metabolity, se mohou zadržovat v organismu a vytvářet toxicitu. Dokonce může v nejzávažnějších případech docházet k poruše nefrotického systému. V případě léčiva penicilin, které se řadí mezi polární látky, dochází k velmi rychlé exkreci (Dostálek, 2006).

Dalším způsobem exkrece léčiv je za pomoci jater. Játra obsahují buňky hepatocyty, které jsou zodpovědné za přestup látky z krve díky jejich sinusoidní a lumenární membráně. Sinusoidní membrána je charakteristická prostupností oběma směry, na rozdíl od lumenární, která je prostupná pro látky rozpustné ve vodě pouze jedním směrem (Martínková *et al.*, 2007). Poté je látka transportována žlučí do střev, kde odchází jako součást stolice z organismu. Avšak ve střevech se můžeme setkat se štěpením konjugátu a následnou reabsorpcí látky zpět do krve (Švihovec *et al.*, 2018). Tento transport může být nejčastěji aktivním, avšak můžeme se setkat s pasivní difuzí. To ovlivňuje, že některé látky mohou prostoupit z hepatocytů a za pomoci systémového oběhu se transportovat do ledvin, kde jsou následně vyloučeny. Játra jsou hlavním orgánem zodpovědným zejména na exkreci konjugátů s kyselinou glukuronovou. V dnešní době je velkým tématem vliv jaterních onemocnění na farmakokinetické procesy léčiv, zejména se hovoří o virové a alkoholové hepatitidě (Dostálek, 2006).



## 3. 2. Léčiva

Léčivem označujeme léčivé látky či léčivé přípravky podávané lidem či zvířatům, za účelem vyvolání biologického účinku v organismu a zlepšení jejich zdravotního stavu (Kertys *et al.*, 2021). Současná výroba léčiv a léčivých přípravků je zprostředkována zejména farmaceutickým průmyslem (Martínková, 2007). Jedna či více léčivých látek společně s pomocnými látkami jsou technologicky zpracovány do konečné formy - tzv. lékového přípravku (farmaka). Jako pomocné látky se využívají např. želatina, metylcelulóza, antioxidanty nebo barviva. Tyto látky nemají svůj vlastní léčebný účinek, avšak ovlivňují vlastnosti léčiva (stabilita, chuť, barva) nebo usnadňují výrobu léčivého přípravku (Švihovec *et al.*, 2018).

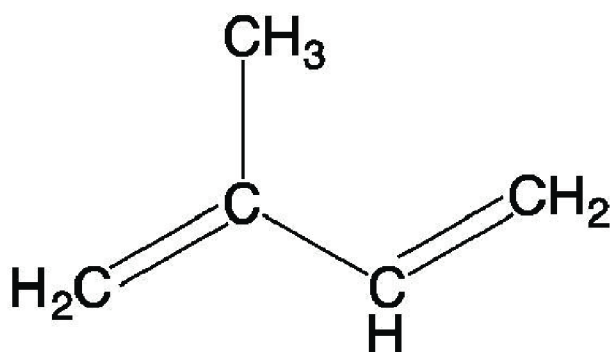
Vývoj nových léčiv je velmi složitý a zejména nákladný proces. Nákladnost vývoje léčiv je způsobena výzkumnou prací s cílem najít nové molekuly vhodné k užití v podobě léčiv. Vývoj léčiva má několik fází. První fáze je nalezení kandidátní molekuly vhodné k farmakologickému použití. Mezi postupy nalezení nových molekul, jako potencionální léčiva, patří například modifikace chemické struktury již známého léčiva, vyhledání různých přírodních látek a jejich použití ve farmakologickém testování, nebo cílená syntéza látek s navrženou strukturou. Další fází je preklinické testování, kde je molekula testována na buňkách a zvířatech pro stanovení toxicity. Pokud lék projde preklinickým testováním, započiná testování na lidských dobrovolnících - tzv. klinické testování (Švihovec *et al.*, 2018). Klinické testování má tři části a posuzuje se účinnost a bezpečnost pro lidský organismus. Vývoj nových léčiv je však podroben přísným pravidlům, z důvodu souvisejících rizik, jako jsou například nové nežádoucí účinky. Nové kandidátní látky jsou tak podrobovány přísné selekci a pouze malá část z těchto nových látek je zařazena k používaným lékům (Lincová *et al.*, 2007).

### 3. 2. 1. Triterpeny

Terpeny patří mezi přírodní sloučeniny nacházející se v živých organismech, zejména v rostlinách, ovoci, houbách, ale vzácně i v některých zvířatech. Je to velmi rozmanitá a početná skupina rostlinných sekundárních metabolitů, která se neúčastní hlavních metabolických drah organismu (Zhou *et al.*, 2017). V současné době je známo přes 25 000 odlišných sloučenin. Terpeny se rozdělují dle počtu stavebních molekul

isoprenu (Obr.7) na monoterpeny, seskvi-, di-, sester-, tetra-, poly- a triterpeny (Hajdúch *et al.*, 2004).

Triterpeny řadíme z chemického hlediska mezi isoprenoidy skládající se z šesti isoprenových jednotek. (Thimmappa *et al.*, 2014). Existuje celá řada struktur, v současné chvíli je identifikována zhruba 200 odlišných struktur. Prekurzorem pro vznik triterpenů je organická sloučenina skvalen. Skvalen se vyskytuje převážně v játrech žraloka nebo v rostlinných olejích. Je často využíván ve farmaceutickém i kosmetickém průmyslu pro své antioxidační účinky (Xu *et al.*, 2004).

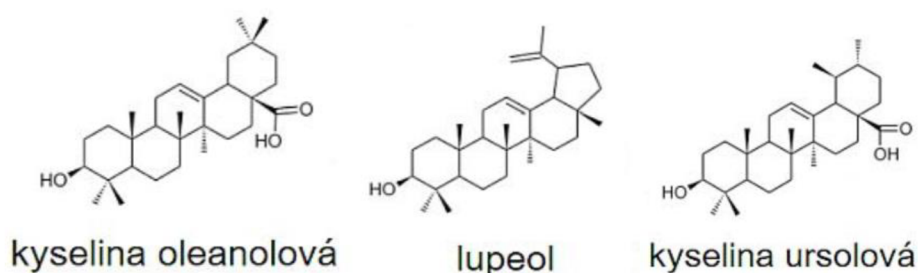


**Obrázek 7** - Struktura isoprenu, převzato z Almarie, 2020

Jednoduché triterpeny můžeme nalézt jako součást povrchových vosků a specializovaných membrán. V některých případech mohou triterpeny hrát roli jako signální molekuly. V případě komplexních triterpenů je jejich funkcí ochrana proti patogenům nebo škůdcům. Mnoho triterpenů izolovaných z přírodních zdrojů jsou biologicky aktivní. I přes biologickou aktivitu mají izolované triterpeny komplikované použití. Mezi nevýhody patří jejich nedostatečné IC50 v rámci cytotoxicity při porovnání s jinými léčivy. IC50 můžeme charakterizovat jako míru koncentrace inhibiční látky k tomu, aby došlo k inhibici biologického procesu o 50 %. V případě triterpenů se jedná o koncentraci, která je smrtelná pro 50 % nádorových buněk. Další komplikací je jejich nízká rozpustnost v polárních médiích. To má za následek problémy s biologickou dostupností. Výhodou triterpenů je jejich obvykle nízká toxicita, proto je u nich dosáhnuta vyšší maximální tolerovaná dávka. Nejvýznamnější výhodou jsou však jejich rozsáhlé mechanismy účinků, mezi nimi jsou jak neobvyklé, tak doposud neobjevené. Díky tomu jsou triterpeny předmětem zájmu pro jejich možnost být alternativní léčbou rezistentní rakoviny, mikrobiálních, parazitárních, nebo virových onemocnění (Soural *et al.*, 2015).

Triterpeny si dále připisují protizánětlivé účinky spojené se schopností inhibovat 5-lipoxygenázu nebo lidskou leukocytární elastázu (HLE). 5-lipoxygenáza, neboli 5-LO, je důležitým enzymem syntézy biologických mediátorů zánětlivých onemocnění či spojených s hypersenzitivitou (astma, artritida, Crohnova choroba či onemocnění kardiovaskulárního systému). Tyto mediátory se označují jako leukotrieny. Mezi inhibitory leukotrienů řadíme boswellovou kyselinu či oleanolovou kyselinu (Džubák *et al.*, 2004)

Triterpeny se běžně objevují v rostlinách (př. ve smetánce lékařské) nebo v ovoci (jablka, hrušky či brusinky). Zástupce triterpenů se vyskytují například i v pryskyřici stromu *Boswellia serrata*. V případě hub je nejvýznamnější z pohledu obsahu triterpenů *Ganoderma lucidum* (Reishi), u které bylo izolováno přibližně 150 derivátů této sloučeniny. Mezi nejvýznamnějších struktury patří oleanové (oleanolová kyselina a boswellová kyselina), ursanové (ursolová kyselina), nebo lupanové (lupeol, betulinová kyselina či betulin) deriváty triterpenů (Obr.8). Oleanolovou kyselinu můžeme nalézt jako součást kořene ženšenu. U této kyseliny se objevuje řada protinádorových účinků. Velmi významná je také při ochraně jater, léčbě bronchitidy, nebo pneumonie. Podobné účinky vykazuje kyselina ursolová, patřící mezi ursanové deriváty triterpenů. Tato kyselina se vyskytuje zejména ve vyšších rostlinách. Má potenciál u různých typů rakoviny jako jsou rakovina plic, prsu, jater nebo tlustého střeva. Má schopnost inhibovat aktivitu savčí DNA polymerázy  $\alpha$  a  $\beta$  nebo lidské DNA topoisomerázy I a II (Yin *et al.*, 2018). Obě tyto kyseliny mají schopnost inhibovat nádorový růst v myších modelech a indukují jejich apoptózu. Dalšími triterpenoidy s protinádorovými účinky je kyselina betulinová. Tato kyselina se objevuje v bříze či v rostlině konitrodu lékařském (*Gratiola officinalis*). Byla popsána ve vztahu s jejími cytotoxickými aktivitami vůči lymfocytární leukemické linii P-388 nebo vůči buněčné linii lidského melanomu. Jedná se o derivát lupanu (Hajdúch *et al.*, 2004).



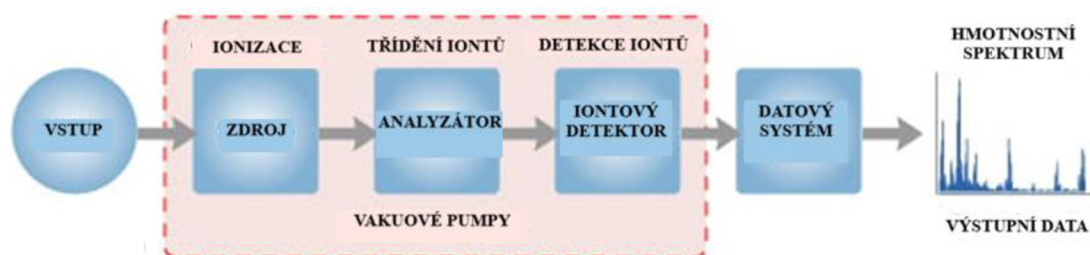
**Obrázek 8** - Zástupci nejvýznamnějších derivátů triterpenů (kyselina oleanolová, lupeol, kyselina ursolová), převzato z <https://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=print&sid=1447> , upraveno

### 3. 3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je separační metodou, díky níž dokážeme analyzovat hmotnosti atomů molekul a jejich fragmentů, které jsou přeměněny na kladné nebo záporné ionty. Je tedy založena na základě interakce nabitých částic s elektrickým či magnetickým polem ve vysokém vakuu (Friedecký *et al.*, 2012). Toto vakuum, o hodnotách přibližně  $10^{-6}$  torr, je důležitou součástí hmotnostní spektrometrie z důvodu zamezení rekombinací a srážkám mezi vzniklými ionty a co největšímu dopadu těchto jednotlivých iontů na detektor. Vakuum, jako součást hmotnostních spektrometrů, je nezbytné v dosažení citlivosti těchto přístrojů (Balíková, 2017). Dále je hmotností spektrometrie výjimečná v její rychlosti, detekčních limitech a rozmanitosti aplikací (De Hoffmann, 2007).

Historie hmotnostní spektrometrie sahá do konce 19. století, kdy Sir Joseph J. Thomson (1856-1940) publikoval práci, která poprvé poukázala na možnosti využití této metody v chemické analýze. Thomson je od těch dob považován za zakladatele hmotnostní spektrometrie. Vývoj této metody probíhal dále po desetiletí. Během těchto let byla tato vyvíjející se metoda využívána v objevování nových izotopů a jejich atomových hmotností. Důležitým milníkem byly 80. léta 20. století, kdy byla zavedena ionizace elektrosprejem a MALDI. Tento průlom dokázal rozšířit aplikaci hmotnostní spektrometrie (Friedecký *et al.*, 2012).

Hmotností spektrometry se skládají z iontového zdroje, analyzátoru a detektoru iontů (viz. obr. 9). Zdroj iontů dokáže přivést molekuly do hmotnostního spektrometru a převést je na nabitou nebo ionizovanou formu. Analyzátor separuje jednotlivé ionty podle jejich hmotnosti a náboje za využití elektrických a magnetických polí. Nakonec jsou ionty přiváděny do detektoru, který produkuje elektrický proud. Tento proud se poté zesiluje a následně je detekován (Downard, 2007).



**Obrázek 9** – Schéma hmotnostního spektrometru, převzato a upraveno z <https://microbenotes.com/mass-spectrometry-ms-principle-working-instrumentation-steps-applications/>

Postupy v hmotnostním spektrometru můžeme rozdělit do 5 základních dějů. Zprvu dochází k přívodu vzorku, jeho zplynění a ionizace molekul. Existuje mnoho způsobů ionizačních technik využívané pro hmotnostní spektrometrii. Některé mohou být energeticky náročné se schopností rozsáhlé fragmentace. Řadíme zde elektronovou a chemickou ionizaci nebo ionizaci polem. Ionizace polem je však vyhrazena pouze pro dostatečně těkavé a tepelně stabilní sloučeniny (Balíková, 2017; De Hoffmann, 2007.) Dalšími kroky je separace vzniklých iontů podle hmotnosti, detekce iontů a vytvoření grafického zobrazení (Balíková, 2017).

Výstupem hmotnostní spektrometrie je hmotnostní spektrum. Toto spektrum znázorňuje závislost četnosti iontů na hodnotě  $m/z$  (hmotnost iontu/náboj iontu) a je zobrazováno jako čárový graf. V tomto grafu nalezneme jednotlivé čáry neboli píky, jejichž výška značí relativní četnost iontů. Nejintenzivnější pík je označován jako pík základní. Z velké části je náboj iontů roven 1, tím pádem hodnoty na hmotnostním spektru jsou reálnými atomovými a molekulovými hmotnostmi (Gross *et al.*, 2006).

Spektrum nám může odrážet jak strukturu analyzované molekuly, tak chemickou identitu. Vše ale závisí na podmínkách a způsobu ionizace. Pokud dochází k ionizaci nárazem elektronů je výsledné spektrum reprodukovatelné a charakterizuje chemickou identitu analyzované látky. V případě chemické ionizace, kde se jedná o měkčí ionizaci, obsahují spektra důležité informace o struktuře molekuly a mají roli v objasnění neznámé látky. Reprodukovatelnost jednotlivých spekter vedlo k vytváření jejich rozmanitých knihoven, díky nimž lze za pomoci počítačové techniky porovnávat tyto spektra standardů s námi naměřenými spektry (Balíková, 2017).

Hmotnostní spektrometrie je velice důležitá v oblasti zjištění chemických struktur. V současné době je velice často spojována v tandemovém uspořádání s plynovou (GC-MS/MS) a kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS).

### **3. 3. 1 Hmotnostní analyzátory**

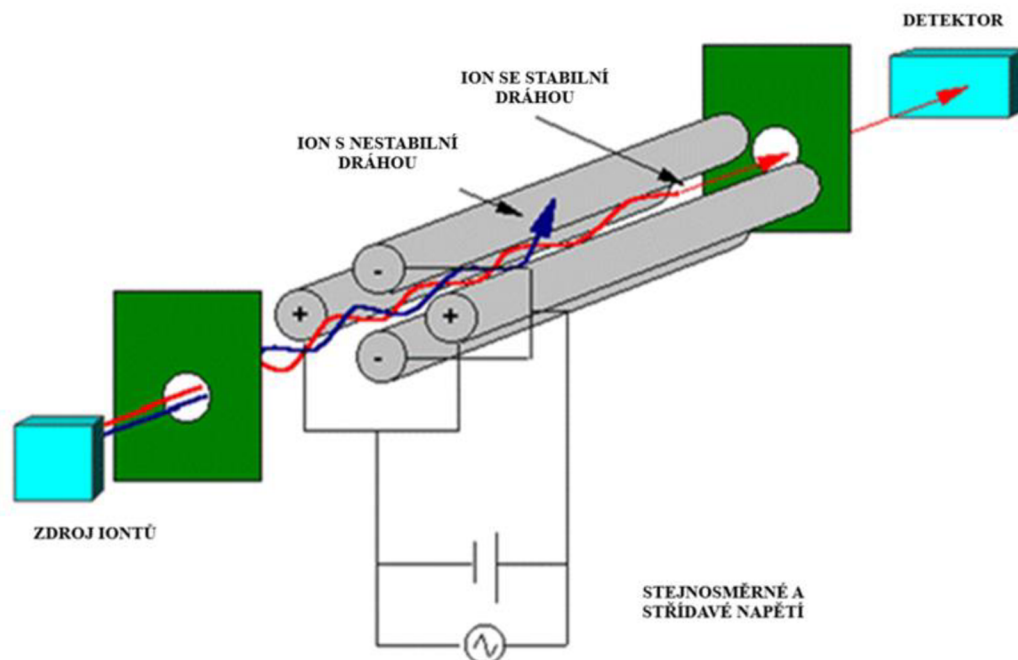
Jednou důležitou částí hmotnostního spektrometru je analyzátor. Zde dochází na základě poměru hmotnosti k náboji k oddělení iontů. Dochází k separaci jednotlivých iontů. Existuje celá řada, nicméně všechny mají společné to, že využívají elektrické či magnetické pole. V současné době mnoho zástupců hmotnostních spektrometrů používá

kombinaci dvou nebo více stejných hmotnostních analyzátorů v rámci jednoho zařízení, tzv. tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Pokud se jedná o spojení dvou a více rozdílných analyzátorů, mluvíme o tzv. hybridní analýze. Mezi zástupce analyzátorů můžeme uvést kvadrupólový analyzátor nebo sektorové přístroje (Prasain *et al.*, 2012; Friedecky *et al.*, 2012). Sektorový analyzátor ovlivňuje dráhy nebo rychlost nabitých částic podle jejich poměru hmotnosti k náboji v elektrickém nebo magnetickém poli (Cottrell *et al.*, 2008). Příkladem analyzátoru je TOF – neboli průletový analyzátor. TOF je analyzátozem doby letu používající elektrické pole k zrychlení iontů. V případě stejného náboje u částic bude identická jejich kinetická energie a rychlost bude záviset zcela na hmotnosti analyzovaných částic. První k detektoru doputují ionty s nižší hmotností, avšak závisí na jejich počáteční rychlosti. To má za následek rozšíření píku zobrazených na grafu. Tento problém řeší spojení se zpožděnou extrakcí (Guilhaus *et al.*, 1997). Dalším typem jsou analyzátory, které mají schopnost zachytit ionty v tzv. cele nebo pasti. Od toho se tyto analyzátory nazývají např. iontová past či elektrostatická iontová past - tzv. Orbitrap. Tyto analyzátory fungují na základě Fourierově transformace (Friedecký *et al.*, 2012).

### **3. 3. 1. 1 Kvadrupólový analyzátor**

Kvadrupólový analyzátor patří mezi velmi rozšířené analyzátory. Prvním, kdo popsal jeho princip, byl fyzik Paul Wolfgang, nositel Nobelovy ceny, a to v 50. letech 20. století (El-Aneed *et al.*, 2009). Jeho součástí jsou čtyři rovnoběžné paralelní tyče, na které je přiváděno proměnlivě stejnosměrné a střídavé napětí. Analyzátozem prochází ionty pouze v určitém rozsahu poměru hmotnosti k náboji. Ionty, které mají nestabilní dráhu jsou vychýleny a nebudou tak detekovány (Obr. 10) (Friedecký *et al.*, 2012). Pořizovací cena kvadrupólového analyzátoru je oproti jiných analyzátorů poměrně nižší. Další výhodou je, že je relativně malý a snadno udržovatelný. Nicméně jeho hmotnostní rozsah se pohybuje do 4000 Da (El-Aneed *et al.*, 2009). U kvadrupólového analyzátoru existují dva možné režimy – skenovací nebo single ion monitoring. Skenovací režim pracuje s kontinuálně se měnícím elektrickým polem. Tento systém dokáže změřit všechny hodnoty poměru hmotnosti k náboji v krátkém časovém sledu. Tento režim je však méně citlivý, avšak lze sledovat všechny vzniklé ionty. Jinou možností je pak režim SIM – single ion monitoring – u kterého je nastavena přesná hodnota velikostí  $m/z$ . Tímto nastavením docílíme toho, že analyzátozem projdou jen ty ionty s danou nastavenou

velikostí. Díky tomuto monitoringu je režim SIM velmi citlivý pro kvantifikaci látek (Friedecký *et al.*, 2012).



**Obrázek 10** – Schéma kvadrupólového analyzátoru, převzato z <https://www.chromservis.eu/sk/popis-gc-ms-tof> , upraveno

### 3. 3. 2 Ionizační techniky

V současné době existuje mnoho variant ionizačních technik. Nicméně všechny mají společný cíl, a to vytvořit nabitě částice, které se později analyzují. Ionty z hlediska polarity vznikají buď kladně nebo záporně nabitě. Avšak může vzniknou vždy jen jeden z těchto typů. Proto můžeme ionizaci rozdělit na pozitivní a negativní. Z hlediska dodané energie při ionizaci můžeme iontové zdroje rozdělit na „tvrdé“ a „měkké“. Představitelem „tvrdé“ ionizace je tzv elektronová ionizace (EI). „Měkkí“ variantou oproti elektronové ionizaci je poté ionizace chemická (CI). Mezi velmi šetrné a „měkké“ ionizace, u kterých nedochází k fragmentaci, řadíme ionizaci elektrosprejem (ESI) a MALDI (Friedecký *et al.*, 2012).

Elektronová ionizace (EI), dříve ionizace nárazem elektronu či dopad elektronů, se využívá zejména v organické hmotnostní spektrometrii. Je vhodná pro nepolární až



středně polární látky, u kterých se jejich relativní molekulová hmotnost pohybuje do 800. Dnes je často využívána u spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Princip je založen na rychlém a energetickém přiblížení elektronu k neutrální částici analytu přeměněného do plynné fáze za vzniku iontu. Může také dojít k uvolnění valenčního elektronu. Tento způsob ionizace je velmi rychlý, avšak způsobuje rozsáhlou fragmentaci, při které mohou chybět molekulární ionty (Lemr a Borovcová, 2020).

Tvrdou ionizaci v podobě elektronové ionizace doplňuje měkčí metoda chemické ionizace (CI) (Dass, 2007). Při této metodě nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci, jak je tomu právě u EI. Principem chemické ionizace je reakce iontu reakčního plynu s molekulou analytu. Relativní intenzita signálu, které se následně zobrazí ve spektru, je odpovídající celé molekule analytu. Díky chemické ionizaci tak můžeme získat informace o molekulární hmotnosti. Je však určena pro těkavé látky, stejně jako je tomu v případě ionizace elektronové (Munson, 2000)

Zvolená technika ionizace je závislá na různých aspektech, jako jsou především vlastnosti analytu, vzorku nebo účelu celkové analýzy. V případě potřeby identifikovat látku a následně ji porovnat se spektry v knihovně je vhodnou technikou „tvrdá“ ionizace. Naopak „měkčí“ techniky ionizace jsou vhodnými k určení molekulové hmotnosti, avšak může dojít k absenci dat o struktuře látky (Lemr a Borovcová, 2020).

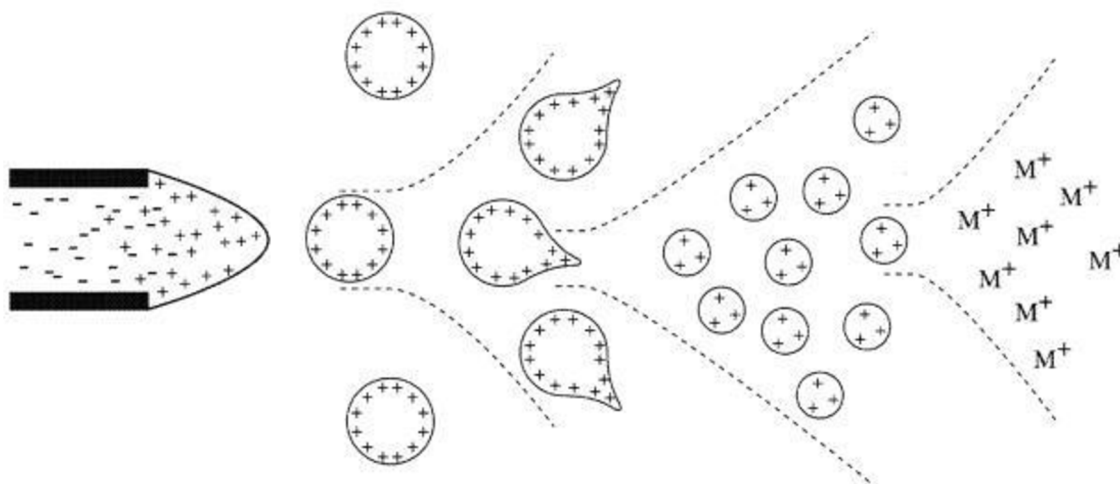
### **3. 3. 2. 1 Ionizace elektrosprejem**

Velmi důležitou metodou v oblasti studie struktur molekul a kvantitativního měření metabolitů je ionizace elektrosprejem (ESI). Tato metoda je vhodná pro netěkavé a tepelně labilní molekuly, kde dokáže být velmi citlivá, jednoduchá a spolehlivá. S myšlenkou metody ionizace elektrosprejem přišel v roce 1968 Malcom Dole, avšak vývoj této metody se připisuje Johnu Fennovi v letech 1989-1990, který byl posléze za tento přínos oceněn v roce 2002 Nobelovou cenou (Dass, 2007).

ESI se využívá k zajištění lepšího přenosu iontů ze vzorku do plynné fáze před samotnou analýzou (Ho *et al.*, 2003). Rozpuštěný vzorek v pufu nebo v rozpouštědlu je přiváděn do kovové kapiláry, obsahující špičku s vysokým napětím (3-4 kV) vůči stěnám okolní komory (protielektrodě). Tento rozdíl mezi špičkou a protielektrodou způsobuje vznik silného elektrostatického pole, díky němuž dochází k rozptýlení roztoku do mlhy



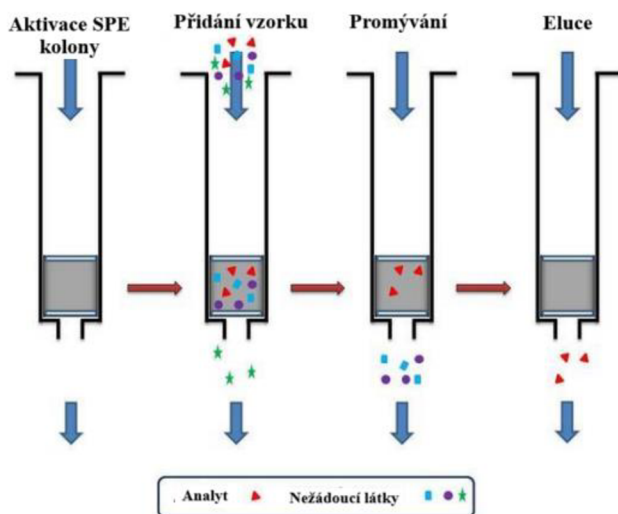
nabitých kapiček. (El-Aneed *et al.*, 2009; Dass 2007). Následuje proces odpařování rozpouštědla, zejména proudem horkého dusíku (Ho *et al.*, 2003; Dass 2007). Tímto procesem dochází k přibližování iontů v kapičce a také její smrštění. Tím vzniká tzv. Taylorův kužel a z něho následně menší kapičky. (Downard, 2007; Ho *et al.*, 2003, De Hofmann *et al.*, 2007) Po dosažení kritického bodu odpudivých sil elektrického pole v nabité kapičce (tzv. Coulombická exploze) dojde k vypuzení iontů z nabitých kapiček do plynné fáze. Tyto ionty jsou následně zachytávány a jsou urychlovány do hmotnostního analyzátoru (Obr. 11) (Ho *et al.*, 2003). Dosažení ideálního provozu ionizace elektrosprejem je docíleno při průtoku 2–10  $\mu\text{l}$  za minutu (Dass, 2007). ESI je možné provádět ve dvou režimech, a to v pozitivním či negativním. Tyto režimy jsou určovány polaritou kapiláry (Downard, 2007). V případě tandemového hmotnostního spektrometru je možnost po analyzování struktur molekul vybrat hromadně prekurzorové ionty a následně fragmentovat v kolizní cele. Tyto ionty jsou pak analyzovány druhým hmotnostním analyzátozem. ESI je také často spojován z důvodu analýzy malých i velkých molekul jiné polarity s vysoce výkonnými kapalinovými chromatografi (HPLC) (Ho *et al.*, 2003).



**Obrázek 11** – Mechanismus ionizace elektrosprejem, převzato z Ho *et al.*, 2003

### 3. 4. Solid phase extraction (SPE)

Jednou z populárních metod dnešní doby je extrakce na pevné fázi (SPE). Principem této metody je rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze – pevnou a kapalnou. Pevná fáze se nachází v podobě sorbentu umístěného v koloně („cartridge“). Jako pevná fáze se využívají materiály na bázi uhlíku (C18) či polymerů. Kapalnou fází je méněna matrice vzorku nebo rozpouštědlo s analyty (Ridgway *et al.*, 2008). Jako rozpouštědla se využívají silné kyseliny nebo organická rozpouštědla. Postup této metody začíná promytím samotné kolony z důvodu její aktivace. Následně je nanesen vzorek na sorbent (pevnou fázi), kdy dochází k odstranění nežádoucích složek. Po promytí, za pomoci elučního rozpouštědla, je provedena eluce zkoumaného analytu z kolony (viz. Obr. 13). Díky SPE lze separovat, zakonzentrovat a také přečistit vzorek (Camel *et al.*, 2003; Ötles *et al.*, 2015). SPE je nenáročná a levná metoda s jednoduchým provedením. Avšak nevýhodu může být v některých případech malá selektivita používaných sorbentů, která má za následek menší citlivosti. Problém malé selektivity řeší směsné sorbenty anebo nově používané imunosorbenty. SPE je možno uskutečnit off-line anebo častěji online (např. systém RapidFire), kdy je tato metoda přímo spojena se separačními metodami např. hmotnostními spektrometry nebo kapalinovou chromatografií. Výhodou je nízká kontaminace vzorku a eliminace ztrát při odpařování (Hennion *et al.*, 1999). Metoda SPE v poslední době čím dál více nahrazuje klasickou extrakci LLE, kde je princip podobný, avšak jedná se zde o rozdělení látek mezi dvěma kapalnými fázemi (Žwir-Ferenc *et al.*, 2006).



Obrázek 12 - Schéma metody extrakce na pevné fázi (SPE), převzato z Al-Karawi, 2016

### 3. 4. 1 RapidFire

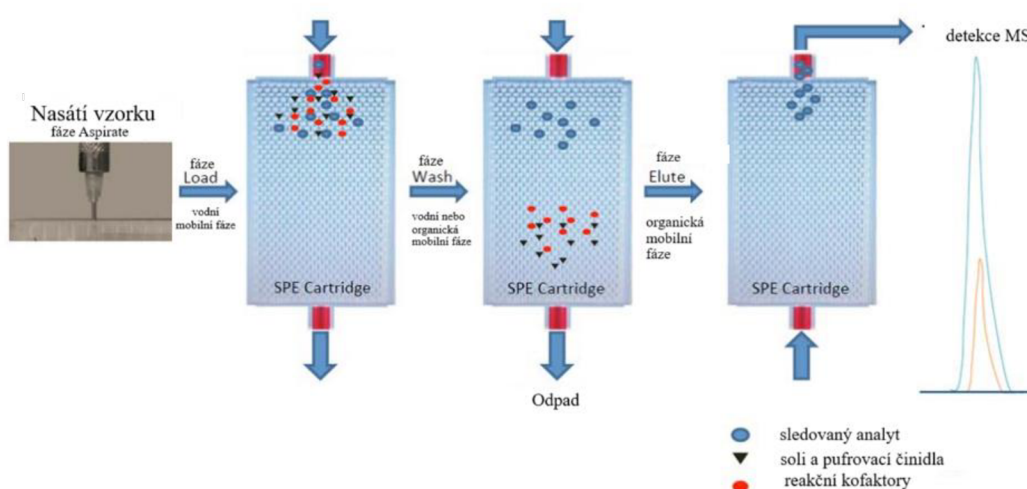
V současnosti se klade důraz, aby byly metody vysoce výkonné, zjednodušené a urychlené, avšak stále spolehlivé. Právě mezi takové metody se řadí systém RapidFire (RF) (Obr. 14). Jedná se o automatickou metodu, která je založena na SPE (extrakce na pevné fázi). Avšak oproti off-line metodě SPE je systém RapidFire vysokorychlostní extrakcí spojenou s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Takto fungující systém dokáže snížit obtížnost a časový průběh analýzy (Veitch *et al.*, 2017). Dokáže poskytnout MS data velmi rychle v řádu sekund. Za pomoci trojitých kvadrupólů je u systému RF maximalizovaná citlivost. Mezi další výhody patří jeho velká kapacita vzorků (Agilent Technologies, 2022).



**Obrázek 13** - RapidFire typu RF400 firmy Agilent Technologies, převzato z <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-instruments/high-throughput-lc-ms/rapidfire-400>

Princípem systému RapidFire je extrakce vzorku z 96jamkové destičky do SPE kolony. Přístroj odsaje vzorek o objemu 15–20  $\mu\text{l}$ . Avšak smyčka určená pro vzorek (tzv. sample loop) má kapacitu přesně stanovenou na 10  $\mu\text{l}$ , tím je zajištěna opakovatelnost analýzy. Zbytek vzorku je odveden do odpadu. Fáze nasátí a naplnění je označována jako Aspirate a trvá přibližně 4 sekundy. Další fází je tzv. Load/Wash, která spočívá

v přemístění ventilu a vymývání vzorku ze smyčky za pomoci proudu vodní mobilní fáze a převedením na SPE kolonu. Analyty jsou zachyceny na pevné fázi SPE kolony a jsou eluovány organickou mobilní fází do hmotnostního spektrometru, kde probíhá detekce. Tato fáze se nazývá Elute. Poslední fází je tzv. Re-equilibrate, kdy se před odsátím dalšího vzorku vrátí ventily a tok mobilní fáze do původního stavu. Analýza jednoho vzorku trvá 8-15 sekund a celá 96jamková destička poté okolo 30 min (Agilent Technologies, 2022; Vrobel *et al.*, 2018).



**Obrázek 14** - Postup extrakce analyzovaného vzorku za pomoci systému RapidFire, převzato a upraveno z <https://www.fda.gov/media/125477/download>

U online metod musíme brát v potaz efekt „carry-over“. Jedná se o nedostatečnou eluci analytu z kolony jednoho ze vzorků. V případě eluce vzorku následujícího dochází k eluci i zbytku analytu vzorku předchozího zůstávající v koloně. Tato chyba vede ke zkreslení výsledných dat zvýšením intenzity detekovaného analytu. Dalším problémem mohou být lipofilní látky. Lipofilní vlastnosti vedou k přilnutí analytu ke stěnám kapilár, které se využívají v transportu mezi RF a MS. To vede k postupné eluci při následujících analýzách a detekováním falešných výsledků. Tento problém je vyřešen zavedením několika tzv. blanků. Blank je slepý vzorek neobsahující žádnou z analyzovaných látek (např. voda). Efekt „carry-over“ se dá eliminovat použitím silných elučnic mobilních fází, čistících roztoků nebo prodloužení fáze Elute a Re-equilibrate (Vrobel *et al.*, 2018)

RapidFire se využívá v oblasti farmacie ke studiu nových kandidátních léčiv (analýza ADME) nebo v toxikologii. Obecně se využívá k analýze exogenních látek nacházejících se ve vyšších koncentracích. I když není RapidFire vhodný pro všechny vzorky, stále patří mezi velmi vysokokapacitní a rychlé metody, u kterých není potřeba fluorescentního ani radioaktivního značení. Mezi kompatibilní vzorky můžeme zařadit pevně nenavazující se na pevnou fázi SPE kolony anebo netvořící labilní metabolity, které by se rozpadaly při ionizaci (plazma, mikrosomální vzorky, supernatanty buněčných kultur a tkáňové extrakty). Využití systému RapidFire se neustále rozvíjí, nicméně v České republice je dostupný prozatím pouze jeden takový přístroj, a to na pracovišti UMTM v Olomouci (Vrobel *et al.*, 2018; Agilent Technologies, 2022).

## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Použitý materiál**

#### **4.1.1 Biologický materiál**

V tomto experimentu byla použita lidská plazma (transfúzní oddělení Fakultní nemocnice Olomouc, ČR) a lidské jaterní mikrosomy (HMMCPL, Thermo Fisher Scientific, USA).

#### **4.1.2 Použité chemikálie a roztoky**

##### **Chemikálie**

- Acetonitril LC-MS čistoty (VWR, kat. č. BDH83640.100E)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, kat. č. 12300-31000)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Penta, kat. č. 12330-31000)
- Dodekan (Sigma-Alsrich, kat. č. 8205430100)
- Ethanol (Penta, kat. č. 71250-11001)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Penta, kat. č. 15140-31000)
- Hydroxid draselný (Penta, kat. č. 15520-31000)
- Chlorid draselný (Penta, kat. č. 16200-31000)
- Chlorid sodný (Penta, kat. č. 16610-31000)
- Isocitrát dehydrogenáza (Sigma-Aldrich, kat. č. 12002)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, kat. č. 19360-11000)
- Kyselina mravenčí (Fluka, kat. č. 94318)
- Lecitin (Sigma-Aldrich, kat. č. 94318)
- Methanol (VWR, kat. č. 102775-450)
- NADP (Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát; Sigma-Aldrich, kat. č. N0505)
- Síran hořečnatý (Sigma-Aldrich kat. č. N0505)
- Voda (VWR, kat. č. BDH23595.400)
- Triterpeny použité v tomto experimentu byly poskytnuty skupinou pana doc. RNDr. Milana Urbana, Ph. D. z Katedry organické chemie, PřF, UPOL

## **Roztoky a jejich příprava**

- 1x PBS pufr – 8,01 g NaCl, 0,21 g KCl, 1,5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 3,6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, rozpustit v 500 ml dH<sub>2</sub>O a upravit na pH 7,4 za pomoci HCl, doplnit vodou do objemu 1 l
- NADPH generující systém: dva roztoky - 0,44 mg NADP v 71 ul 1x PBS pufru, 1,335 mg isocitrátu v 71 ul 1x PBS pufru, smíchání těchto dvou roztoků a přidat 14,3 ul isocitrát dehydrogenázy a poté 56,25 ul MgSO<sub>4</sub>
- 100 mM dihydrogenfosforečnan draselný (pH 7,4): 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 500 ml H<sub>2</sub>O, upravit na dané pH
- Mobilní fáze A (1000 ml): 950 ml H<sub>2</sub>O, 50 ml acetonitrilu, 1 ml kyseliny mravenčí
- Mobilní fáze B (1000 ml): 950 ml acetonitrilu, 50 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml kyseliny mravenčí

### **4. 1. 3 Přístroje a zařízení**

- Analytické váhy GR202 2202G (Schoeller Instruments s.r.o.)
- Centrifuga 514R (Hanil)
- Digestoř Biohazard Thermo (Thermo Scientific)
- Destička určená pro metodu PAMPA (Merck Milipore), donor (kat. č. MATRNPS550) a akceptor (kat. č. MAIPN4550)
- Lyofilizační systém: CoolSafe (ScanVac), vakuová pumpa (Vacuubrand), centrifuga (Thermo Scientific)
- Laboratorní pH metr, pH 50 se sondou CHS ChemFlex NTC30 (VioLab)
- Magnetická míchačka s ohřevem MR Hei-Tec (Heidolph Instruments)
- Předvážka PS 1500/X (Radwag)
- Termoblok TS-100C (BIOSAN)
- Třepačka PSU-10i (Grant Instruments)
- Třepačka temperovaná ES-2 (BIOSAN)
- Vortex Genius 3 (IKA)
- Voetex MS 3 basic (IKA)
- RapidFire 300 (Agilent Technologies) a hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB SCIEX)
- Rapid Equilibrium Dialysis (RED) Inserts and Plates (Life Technologies, kat. č. 90006)

## 4. 2 Metodika

### 4. 2. 1 Chemická stabilita

Jednou z důležitých vlastností při studiu kandidátních léčiv je jejich stabilita v roztoku. Rozpuštěné látky dokáží prostupovat přes membrány například za pomoci difúze či za pomoci transportních mechanismů. Jedná se o velmi důležitý zkoumaný parametr. Chemická stabilita testovaných látek spočívá v jejich inkubaci ve fosfátovém pufru po stanovený čas. Za pomoci této metody, při které nejsou využity enzymatické procesy, zkoumáme degradaci látek v daném pufru, který nám představuje fyziologický roztok. Připravené zásobní roztoky triterpenů o koncentraci  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  v roztoku DMSO byly poskytnuty z Chemické knihovny UMTM. Poté bylo do 12jamkové destičky napipetováno  $1349 \mu\text{l}$   $1\times$  PBS pufru společně s  $1 \mu\text{l}$   $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  zásobního roztoku studované látky. Odběry pro stanovení stability látek byly prováděny v odlišných časových intervalech 0, 15, 30, 60 a 120 minut. Látky v pufru byli mezi odběry inkubovány při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  a 250 rpm v třepacím inkubátoru. Jakmile byla látka napipetována do pufru, byla resuspendována a co nejrychleji odebrána multikanálovou pipetou jako triplicát  $75 \mu\text{l}$  vzorku na jamku do 96jamkové destičky jako čas 0. Následně bylo přidáno  $150 \mu\text{l}$  ledově vychlazeného methanolu ke vzorkům k zastavení reakce a destička byla ponechána v chladu. Postupně byly dle stejného postupu zhotoveny všechny následující časové odběry. Po odebrání vzorku v čase 120 minut byla destička nechána 10 min v chladu a následně byli vzorky lyofilizovány. Vzorky byly analyzovány za pomoci systému RF-MS/MS.

### 4. 2. 2 Plazmatická stabilita

Plazma jejíž obsahem jsou početné druhy bílkovin, mezi které můžeme zařadit albuminy, globuliny či fibrinogeny. Stabilita kandidátních léčiv je podstatná k požadovanému účinku. Je důležité, aby bylo zachováno množství látky. Některé látky, mezi které můžeme zařadit esterové či amidové skupiny, jsou náchylnější k hydrolyze uzpůsobené plazmatickými proteiny. Hydrolyza těmito enzymy může způsobit rychlou clearance či krátký poločas rozpadu. V neposlední řadě hydrolyza kandidátního léčiva vede k snížené účinnosti. Plazmatická stabilita spočívá v inkubaci studovaných látek v 100% lidské plazmě.



Zásobní roztoky studovaných látek o koncentraci  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  byly naředěny v 1x PBS pufru na  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztok. Posléze bylo napipetováno do 12jamkové destičky  $1495 \mu\text{l}$  plazmy a  $4,95 \mu\text{l}$   $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku látky. Odběry pro stanovení plazmatické stability látek byly prováděny v časových intervalech 0,15, 30, 60 a 120 minut. Studované látky byly inkubovány v plazmě při  $38 \text{ }^\circ\text{C}$  v třepacím inkubátoru při 250 rpm. Jakmile byla látka přidána do plazmy, byla resuspendována a co nejrychleji odebrána multikanálovou pipetou triplikát  $75 \mu\text{l}$  vzorku na jamku do 96jamkové destičky. Posléze byla reakce zastavena přidáním  $150 \mu\text{l}$  ACN/MetOH v poměru 2:1 ke každému vzorku. Následně byla destička přelepena parafilmem a byla ponechána v chladu. Tento postup byl identický pro následující časové odběry. Jakmile byl vzorek odebrán v čase 120 minut byla destička uchována při  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  přes noc. Následující den byla destička se vzorky nechána rozmrazovat při pokojové teplotě a poté centrifugována při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a 4000 rpm po dobu 10 minut. Po stočení v centrifuze bylo odebráno  $100 \mu\text{l}$  supernatantu do nové 96jamkové destičky. Poté byly vzorky lyofilizovány. Vzorky byly analyzovány za pomoci systému RF-MS/MS.

#### 4. 2. 3 Mikrosomální stabilita

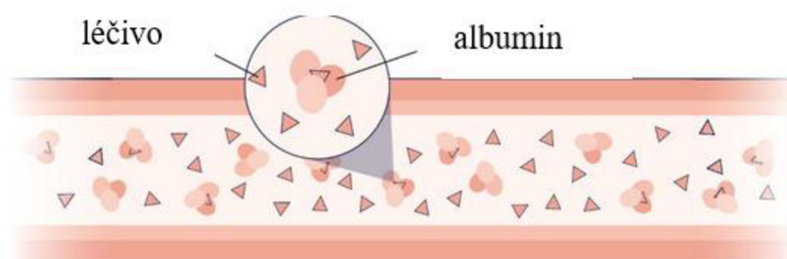
Mikrosomy jsou částice vznikající při degradaci hladkého endoplazmatického retikula jaterních buněk. Mikrosomy jsou místem, kde dochází k enzymatické reakci spojené s cytochromem P450, a také s konjugací enzymy. Tyto enzymy jsou důležité pro metabolismus léčiv a xenobiotik. Cílem biotransformace je z léčiva, které má obvykle lipofilní charakter, vytvořit látku hydrofilní. Hydrofilní léčivo je poté lépe vyloučeno z těla ven. Jaterní mikrosomy se využívají z důvodu snadného použití, nízké ceny a reprodukovatelnosti. V testu mikrosomální stability se uplatňuje NADPH generující systém (Medvedíková *et al.*, 2021). Mikrosomální stabilita je založena na plazmatické clearance. Je to pouze jedním z mechanismů vylučování látek, nicméně je zařazován mezi ty hlavní.

K mikrosomální stabilitě studovaných látek byly využity lidské jaterní mikrosomy. Nejprve byl vytvořen NADPH generující systém, který obsahuje nikotin adenin dinukleotid fosfát, isocitrát sodný, síran horečnatý a. Dle počtu testovaných látek byla za pomoci protokolu vytvořen tento systém. Ke každé látce bylo napipetováno do 12jamkové destičky  $913 \mu\text{l}$  dihydrogen fosforečnan draselný,  $28 \mu\text{l}$  mikrosomů a  $67,4 \mu\text{l}$

NADPH generujícího systému. Tato směs byla preinkubována po dobu 5 min v třepacím inkubátoru při 38 °C a 250rpm. Posléze byly studované látky o koncentraci 10 mmol·l<sup>-1</sup> naředěny v 1x PBS pufru na koncentraci 50 mmol·l<sup>-1</sup> a následně bylo ke směsi přidáno 127 µl takto připraveného roztoku studované látky a resuspendováno. Po přidání látky byl odebrán multikanálovou pipetou triplikát 75 µl vzorku na jamku do 96jamkové destičky. Poté byla reakce zastavena 100 µl ACN/MetOH v poměru 2:1 ke každému vzorku a destička byla přelepena parafilmem a přenesena do chladu. Látky se směsí byli inkubovány při teplotě 38 °C v třepacím inkubátoru. Odběry pro stanovení mikrosomální stability byly odebírány v časových intervalech 0, 15, 30, 60 minut. Po odběru v časovém intervalu 60 min byla destička po dobu 10 min ponechána v chladu a poté centrifugována při teplotě 4 °C a 3000 rpm po dobu 10 min. Následně bylo odebráno 100 µl supernatantu do nové 96jamkové destičky a lyofilizováno. Vzorky byly analyzovány za pomoci systému RF-MS/MS.

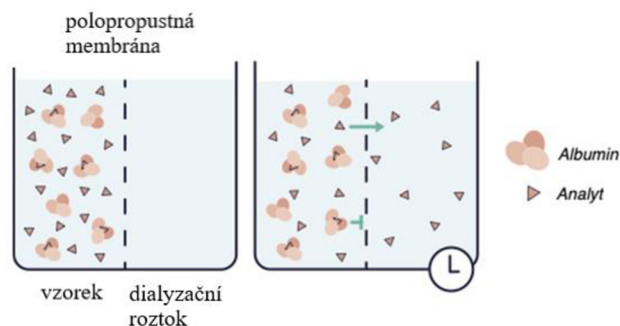
#### 4. 2. 4 Vazba na proteiny

U látky, která je ve vazbě na plazmatické proteiny, je ovlivněna její distribuce v organismu a zároveň její účinnost. Ta je uzpůsobena pouze volnou frakcí nikoliv vázanou. Mezi plazmatické proteiny schopné vázat látky patří albumin, lipoproteiny nebo  $\alpha$ - nebo  $\beta$ - globuliny.



**Obrázek 15** - Interakce molekul léčiva s plazmatickým proteinem albuminem, převzato a upraveno z Ahmed *et al.*, 2022

Pro určení vazby na proteiny byl využit RED test (Rapid Equilibrium Dialysis), který je založený na dialýze využívající polopropustnou membránu. Tato membrána je schopna oddělit vázanou frakci od nenavázané. Skládá se ze dvou komůrek, red (R) a white (W). Komůrky od sebe dělí polopropustná dialyzační membrány.



**Obrázek 16** – Princip RED testu, převzato a upraveno z Ahmed *et al.*, 2022

Pro tuto metodu byla využita lidská plazma, která byla rozmrazena při pokojové teplotě. Poté byla zředěna na 5% roztok. Základna komůrky (tzv. Teflon base plate) byla promyta ethanolem (20%) po dobu 10 min. Po uplynutí 10 minut byla deska promyta ultračistou vodou. Poté byly do desky vloženy s opatrností komůrky red a white tak, aby nebyla porušena polopropustná membrána. Ze studovaných látek o koncentraci  $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  byly připraveny roztoky, kdy bylo napipetováno  $1 \mu\text{l}$  látky a  $999 \mu\text{l}$  10% plazmy. Následně bylo do red komůrky (R) napipetováno  $300 \mu\text{l}$  plazmy s látkou a do white komůrky (W) bylo napipetováno  $500 \mu\text{l}$  1x PBS pufru. Komůrka pak byla přelepena adhezivní fólií a poté byly inkubovány po dobu 4 hodin při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  za stálého třepání v inkubátoru (250 rpm). Po 4 hodinách bylo z komůrek odpipetováno  $200 \mu\text{l}$  a přeneseny do 48jamkové destičky. K odebranému roztoku z red komůrky bylo přidáno stejné množství PBS a z white komůrky plazma. Následně byla reakce zastavena za pomoci  $400 \mu\text{l}$  ACN/MetOH v poměru 2:1. Destička posléze byla ponechána při  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  přes noc v mrazáku. Následující den byla destička centrifugována při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a 4000 rpm po dobu 10 min. Po stočení bylo odebráno dvakrát  $200 \mu\text{l}$  supernatantu do 96jamkové destičky a poté lyofilizovány. Vzorky byly analyzovány pomocí systému RF-MS/MS.

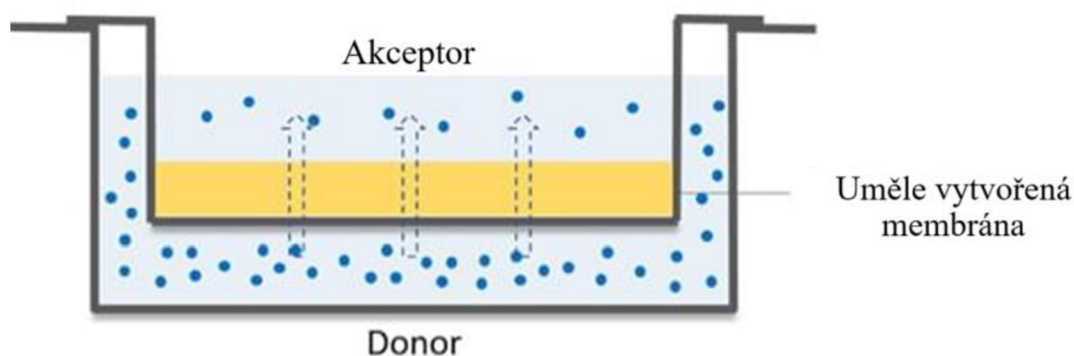
Výsledky vazby na plazmatické proteiny byly vypočítány za pomoci matematického vzorce (viz. Obr 18). Rozdíl v koncentracích nacházející se v komůrkách red a white po inkubaci je podstatný pro stanovení procenta návaznosti studovaných látek na proteiny.

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

**Obrázek 17** – Vzorec pro vypočítání vazby na plazmatické proteiny, legenda:  $f_u$  – množství volné frakce,  $PC$  – koncentrace testované látky navázané na plazmatické proteiny (v červené komůrce),  $PF$  – koncentrace difundované látky nacházející se v bílé komůrce, převzato a upraveno z [www. cyprotex.com](http://www.cyprotex.com)

#### 4. 2. 5 Metoda PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay)

Studium léčiv během preklinického vývoje zahrnuje testování prostupnosti látek přes uměle vytvořené membrány. Mezi takové metody patří modely založené na buněčných liniích, např. Caco-2 buňky anebo nebuněčné modely využívající uměle vytvořené membrány. Mezi nebuněčné modely řadíme *in vitro* pasivní difúzi PAMPA, která je založena na transportu z prostředí s vysokou koncentrací do prostředí s nižší koncentrací bez energetických nároků přes uměle vytvořenou lipidovou membránu (Medvedíková *et al.*, 2021). Tyto membrány mohou být potaženy různými typy lipidů, například směsí lecitinů v organickém rozpouštědle (Avdeef *et al.*, 2005). Za pomoci této metody dokážeme stanovit permeabilitu látek, která putuje z donorové „spodní“ části přes umělou membránu do akceptorové „horní“ části. Využívá se mikrotitračních 96jamkových destiček k vytvoření tzv. „sendvičová“ soustava (viz. obr. 16) (Chavda *et al.*, 2017). Zkoumané léčivo je vloženo do donorové části modelu a po uplynutí inkubace je měřeno množství látky nacházející se v donorovém kompartmentu a následně v akceptorovém, kde se měří množství difundovaného léčiva (Fantini *et al.*, 2015). Původně byla metoda PAMPA vytvořena pro potřeby predikce gastrointestinální permeability (Avdeef *et al.*, 2005, 2015).



**Obrázek 18** - Schéma modelu PAMPA; převzato a upraveno z <https://www.creative-bioarray.com/Services/pampa-assay.htm>

Do organismu se léčivo může dostat pomocí usnadněného či aktivního transportu, endocytózou, exocytózou anebo právě pasivním transportem (difúzí). Metodou pasivní difúzí (PAMPA) se transportují malé a lipofilní látky. Pro studium ADME začíná být čím dál více tato metoda populární. Využívá se k predikci, zdali daný studovaný kandidátní lék projde či neprojde přes membránu např. střevního epitelu nebo hematoencefalické bariéry (Fantini *et al.*, 2015). To, jak rychle dokáže léčivo prostupovat přes bariéru, značně souvisí s absorbováním léčiv u pacientů (Balimane *et al.*, 2006). Avšak při použití tohoto modelu se eliminuje použití transportérů v uměle vytvořené membráně, a tak nejsou poskytnuta data o absorpci látek prostřednictvím transportérů. Proto se může stát, že budou zpracovávány nesprávná data o celkové propustnosti (Dressman *et al.*, 2008). Metoda PAMPA nicméně poskytuje jednoduchou klasifikaci analyzovaných látek. Udává nám, zdali má látka nízkou, střední či vysokou pravděpodobnost se absorbovat. PAMPA využívá konstanty Papp neboli koeficient propustnosti. Jedná se o vnitřní konstantu stanovující predikci transportu přes bariéru buněčné membrány (viz. obr. 17) (Dahlgren *et al.*, 2022). U látek s nízkou propustností je konstanta Papp menší než  $10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  a u látek s vysokou propustností se pohybuje konstanta Papp nad touto hodnotou.

$$P_{app} = C \times - \ln \left( 1 - \frac{[ \text{ Akceptor L } ]}{[ \text{ Equilibrace L } ]} \right)$$

$$\text{kde } C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times \text{area} \times \text{čas}}$$

**Obrázek 19** - Výpočet koeficientu propustnosti Papp;

legenda: Akceptor L – koncentrace léčiv v akceptorovém kompartmentu, Equibrace L – koncentrace léčiv v equilibriální destičce,  $V_D$  – objem donorového kompartmentu,  $V_A$  – objem akceptorového kompartmentu, area – plocha uměle vytvořené membrány

PAMPA se celkově řadí mezi rychlou a nenáročnou metodu, která poskytuje kvalitní. Metoda je dobře reprodukovatelná a k analýze je potřeba jen malého množství vzorku. Cena analýzy je oproti jiným metodám nižší – a to právě díky malému množství vzorku a rychlosti metody (Chavda *et al.*, 2017, Cabrera-Pérez *et al.*, 2016).

Model pasivní difúze PAMPA je využíván ke stanovení permeability látek přes umělou membránu. Byl vytvořen iniciální a equilibriální roztok. Inicialní roztok (20  $\mu\text{mol}$ ) o objemu 2ml obsahoval zásobní roztok látky (10 mM) s 1x PBS pufrém. Tento vzniklý roztok byl pipetován do 12-jamkové destičky. V další 12-jamkové destičce byl vytvořen roztok equilibriální (450  $\mu\text{l}$  iniciálního roztoku a 225  $\mu\text{l}$  1x PBS pufru). Na spodní část (donor) bylo napipetováno 300  $\mu\text{l}$  iniciálního roztoku. Následně byl v ultrazvukové lázni vytvořen roztok 10% lecitinu v dodekanu. Na membránu horní části (akceptoru) destičky bylo opatrně napipetován v digestoři (špička nesmí porušit membránu) tento roztok 10% lecitinu. Na aktivovanou membránu (průhledná) muselo být nejpozději do 10 min od aktivace napipetováno 150  $\mu\text{l}$  1x PBS pufru. Následně byla horní a dolní část zkompletována, aby došlo ke kontaktu mezi membránou a studovanou látkou. Toto uskupení nazýváme sendvičové. Destička byla následně inkubována za laboratorní teplotě na třepačce (70 rpm) po dobu 18 h ve tmě. Po uplynutí 18 h bylo přepipetován objem 120  $\mu\text{l}$  vzorku do 96-jamkové destičky v daném pořadí – akceptorový, equilibriální, donorový a iniciální roztok. Tyto vzorky byly lyofilizovány a analyzovány za pomoci systému RF-MS/MS.

#### **4. 2. 6 Analýza vzorků za pomoci RF-MS/MS**

Po uskutečnění ADME testování byla stanovena relativní koncentrace za pomoci systému RapidFire typu RF300 firmy Agilent Technologies, který je online propojený s hmotnostním spektrometrem typu QTRAP 5500. Nejprve byly analyzované látky naladěny na daný spektrometr v MRM módu. Následně byla provedena optimalizace používaného spektrometru na studované látky triterpenů. Analýza byla prováděna v pozitivním módu za použití ionizační techniky ESI (tzv. ionizace elektrosprejem). Výstupní data z hmotnostního spektrometru měla rozličné parametry, mezi které můžeme zařadit kolizní energii, deklasterizační potenciál (viz. Tab. č. 1) či nalezené přechody MS/MS (Tab. č. 2). Po stanovení parametrů byly určeny podmínky pro extrakci na pevné fázi (RapidFire). Vzorky, které byly lyofilizovány, jsou před samotnou analýzou RF rozpuštěny v 200  $\mu\text{l}$  mobilní fázi A obsahující přesně stanovené množství interního standardu. Interním standardem je sloučenina známé molekulové hmotnosti, pomocí které jsme schopni detekovat změny v signálu přístroje. Lze tak odstranit chyby změřených koncentrací vzorků během měření přístrojem. Standard není obsažen ve

vzorku a jehož hmotnost je podobná hmotnosti vzorku (Borková, 2020; Mihaljevič *et al.*, 2004). Detekovaný signál interního standardu je porovnán se signálem analytu a je provedena normalizace. Normalizace je uskutečněna poměrem mezi signálem analytu a signálem interního standardu (Volný, 2019). Získané data byla zpracována a vyhodnocena za pomoci počítačového softwaru – RapidFire Integrator a převedena do programu Excel.

**Tabulka 1** – Výstupní parametry stanovené hmotnostním spektrometrem na příkladu studované látky LEM00018315, legenda: DP – deklasterizační potenciál, CE – kolizní energie, CXP – výstupní potenciál

<b>Látka</b>	<b>Q1 Mass</b>	<b>Q3 Mass</b>	<b>DP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
<b>LEM00018315</b>	<b>(Da)</b>	<b>(Da)</b>	<b>(Volts)</b>		
	529,3	105,1	191	89	12
		114,9	191	127	20
		128	191	129	20
		145,1	191	57	8

**Tabulka 2** – MS/MS přechody stanovené hmotnostním spektrometrem používané u jednotlivých studovaných triterpenů LEM00018315, LEM00129909 a LEM00129910

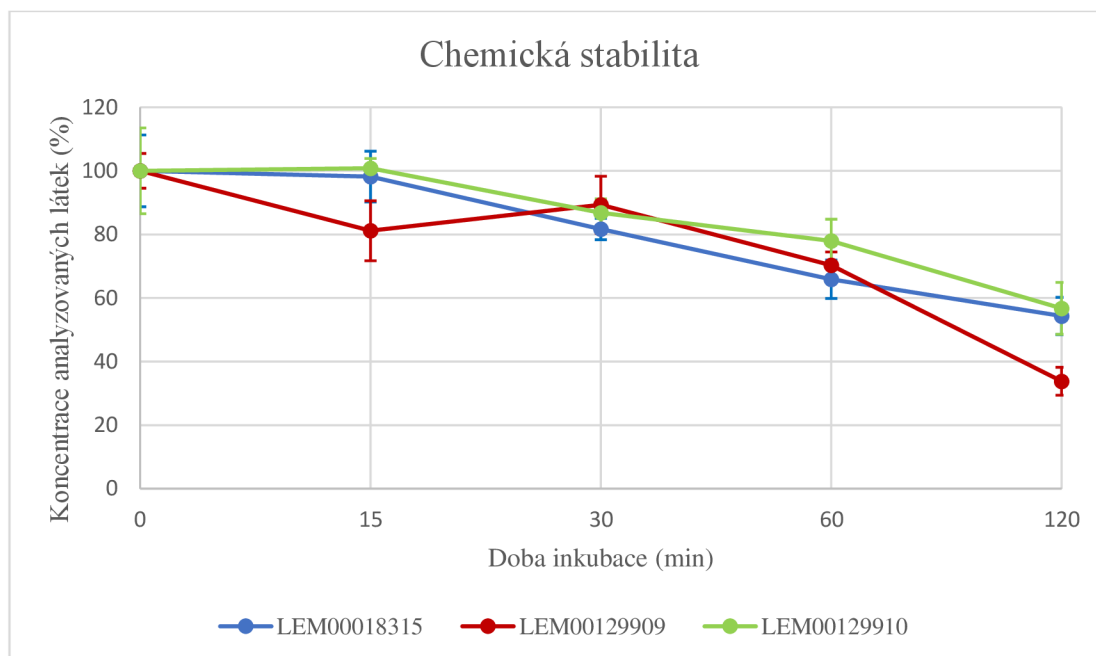
<b>Látka</b>	<b>MS/MS přechod</b>
<b>LEM00018315</b>	529,3/105,1
<b>LEM00129909</b>	581,3/248,1
<b>LEM00129910</b>	587,3/149

## 5 Výsledky

### 5.1 Chemická stabilita

Stabilita vzorku je velmi důležitou a požadovanou vlastností léčiva. U vzorků kandidátních léčiv triterpenů byla nejprve stanovena chemická stabilita. Testované látky triterpenů byly podrobovány inkubaci ve fosfátovém pufru. Tento pufr slouží jako obdoba fyziologického roztoku. Látky poté byly odebírány v časových intervalech 0, 15, 30, 60 a 120 minut. Dle výsledků (viz. Graf č.1) je patrné, že relativní koncentrace analyzovaných látek u všech tří vzorků po 120 minutách byla stanovena pod 60 % z původní koncentrace, kterou charakterizuje čas 0. U vzorku LEM00129909 byla tato hodnota relativní koncentrace dokonce pod 35 %. To svědčí o velmi špatné chemické stabilitě studovaných látek, jelikož úbytek koncentrace od času 0 (původní koncentrace) až po čas 120 je o více jak 40 %. Tato ztráta může být způsobena neenzymatickými procesy. Naopak nejvyšší naměřená hodnota chemické stability byla u látky LEM00129910, kde se úbytek od počáteční koncentrace pohyboval okolo 57 %.

**Graf 1** – Chemická stabilita studovaných triterpenů LEM00018315, LEM00129909 a LEM00129910 – závislost relativní koncentrace (%) triterpenů na době inkubace (min) ve fosfátovém pufru



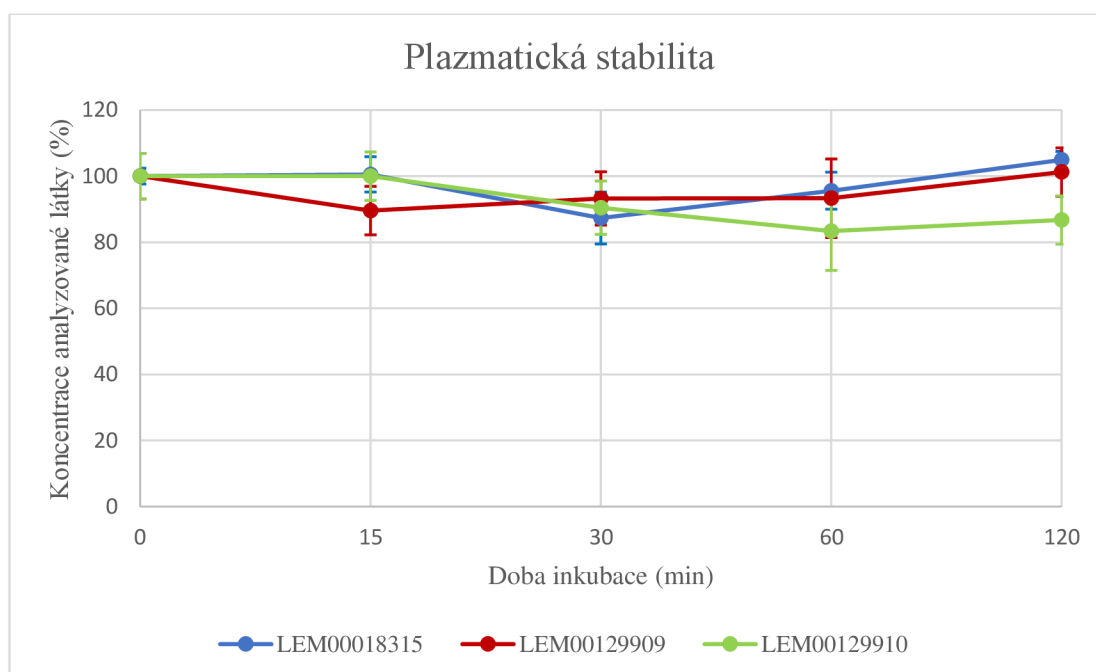


## 5. 2 Plazmatická stabilita

V případě plazmatické stability byla zjišťována náchylnost k hydrolyze plazmatickými enzymy. Působení těchto enzymů může mít za následek plazmatickou nestabilitu.

Analyzované vzorky triterpenů byly inkubovány ve 100% lidské plazmě. Následně byly tyto vzorky postupně odebírány, a to v časech 0, 15, 30, 60 a 120 minut. Každá ze tří studovaných látek vykazovala velmi dobrou plazmatickou stabilitu viz. Graf č. 2. Relativní koncentrace analyzovaných látek u všech tří vzorků triterpenů byla po dvou hodinách inkubace vyšší než 85 % v porovnání s původní koncentrací při odběru v čase 0. Tyto látky vykazovaly dobrou stabilitu, úbytek od původního množství může být způsoben účinkem enzymů obsažených v plazmě.

**Graf 2** – Plazmatická stabilita studovaných triterpenů LEM00018315, LEM00129909 a LEM00129910 – závislost relativní koncentrace (%) triterpenů na době inkubace (min) ve 100% lidské plazmě



## 5. 3 Vazba na plazmatické bílkoviny

Vazba na plazmatické bílkoviny je zásadní v účinku a také distribuci léčiv. Tato vazba u studovaných triterpenů byla stanovena za pomoci RED testu (Rapid Equilibrium Dialysis). Za pomoci vzorce byla z koncentrací v red a white komůrkách vypočítána

návaznost triterpenů na bílkoviny v plazmě. U všech tří analyzovaných látek bylo zjištěno vysoké procento vázané frakce na plazmatické proteiny viz. tabulka č. 3 (více jak 97 %). U látky LEM00129909 je tato hodnota dokonce 98,45 % vázané frakce. Nicméně pro požadovaný účinek a správnou distribuci léčiv v organismu je důležitá vysoká hodnota nenavázané tzv. volné frakce nikoliv vázané, jako to je v případě výsledků studovaných vzorků triterpenů.

**Tabulka 3** - Výsledná data o procentu vázané frakce testovaných triterpenů za pomoci RED testu

Testované látky	RED test ( <i>in vitro</i> ) – vázaná frakce (%)
LEM00018315	97,37 ± 0,81
LEM00129909	98,45 ± 0,67
LEM00129910	98,42 ± 1,18

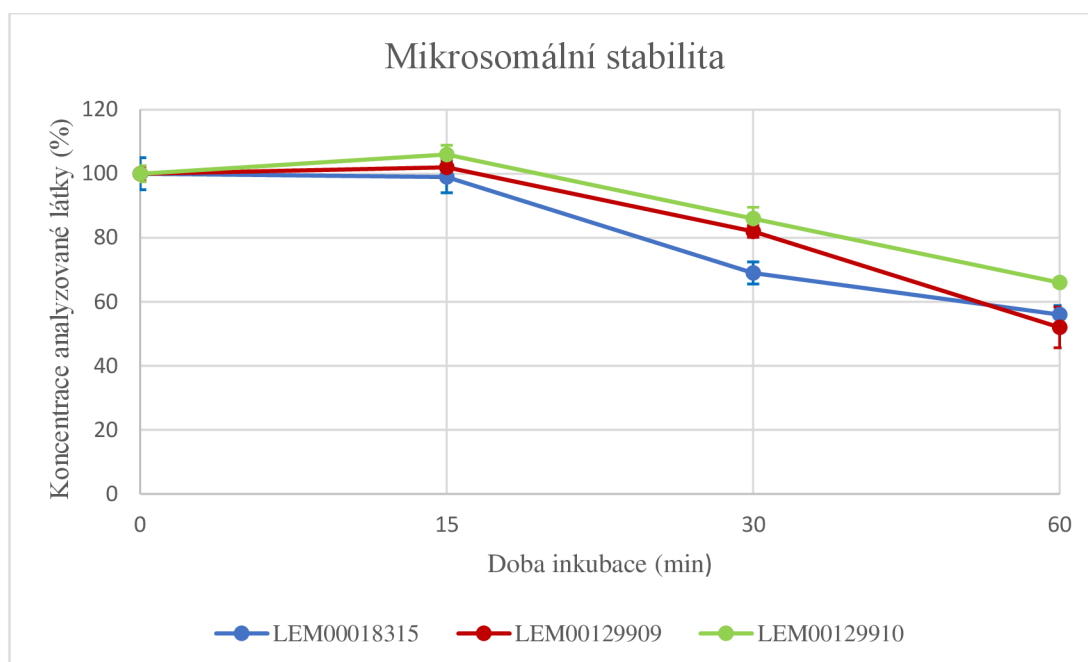
#### 5. 4 Mikrosomální stabilita

K analýze metabolismu a plazmatické clearance se využívá test mikrosomální stability. Vzorky studovaných triterpenů byly inkubovány společně s lidskými jaterními mikrosomy a NADPH generujícím systémem. Odběr byl prováděn v různých časových intervalech (0,15, 30, 60 a 120 minut). Dle výsledných hodnot zobrazených na grafu č. 3 lze pozorovat pokles relativní koncentrace analyzovaných látek. U látky LEM00129910 je tento pokles z původní koncentrace na hodnotu 66 %, LEM00129909 je tento pokles až na hodnotu 52 %. Studované triterpeny byly posléze zařazeny do jednotlivých kategorií dle výpočtu jejich vnitřní clearance ( $CL_{int}$ ) viz. obr. 18. Všechny tři látky triterpenů (LEM00018315, LEM00129909 a LEM00129910) byly klasifikovány ke středně vysoké hodnotě vnitřní clearance., což značí rychlý metabolismus biotransformačními enzymy cytochromu P450.

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

**Obrázek 20** - Vzorec pro výpočet vnitřní clearance, legenda: V – objem v ul,  $t_{1/2}$  – hodnoty poločasu rozpadu, vypočteno  $t_{1/2} = 0,693/k$  – kde k je sklonem přímky závislosti přirozeného logaritmu procenta zbývajících sloučenin na čase

**Graf 3** – Mikrosomální stabilita studovaných triterpenů LEM00018315, LEM00129909 a LEM00129910 – závislost relativní koncentrace (%) triterpenů na době inkubace (min) za přítomnosti lidských jaterních mikrosomů



## 5. 5 Model PAMPA

PAMPA je metodou, která dokáže simulovat pasivní difúzi přes uměle vytvořenu membránu. Většina malých a lipofilních léčiv tak dokáže vstoupit do organismu. Studované triterpeny byly inkubovány po dobu 18 h ve tmě ve speciální sendvičovém uskupení s donorem a akceptorem. Získaná data byla využita v matematických vzorcích pro stanovení relativní permeability studovaných triterpenů. U studovaných látek byla vypočítány hodnoty okolo -8 až -9 (viz. Tab. 4). Dle těchto výsledků byly látky zařazeny do kategorie s nízkou schopností pronikat přes polopropustnou uměle vytvořenou membránu. Nicméně v případě využití metody PAMPA nepočítáme s transportem přes membránu za pomoci transportérů, a proto v tomto případě pouze zvažujeme pasivní transport studovaných látek.

**Tabulka 4** – Výsledná relativní permeabilita u studovaných látek triterpenů zjištěna za pomoci metody PAMPA a následné zařazení do kategorie propustnosti

Testované látky	log Papp	Kategorie
<b>LEM00018315</b>	-8,134 ± 1,223	nízká
<b>LEM00129909</b>	-9,185 ± 0,067	nízká
<b>LEM00129910</b>	-8,881 ± 0,386	nízká

## 5. 6 Vyhodnocení dat

Dle Tab. 5 lze prezentovat vyhodnocení dat získaných při analýze plazmatické stability. Jedná se o studovanou látku LEM00129909 s jejím zvoleným vhodným standardem (látkou LEM00129910). Při plazmatické stabilitě byl odebírána triplikát vzorku v každém časovém intervalu. Stejně tomu bylo i v případě chemické a mikrosomální stability. Za pomoci systému RapidFire byly analyzovány studované látky a stanovena jejich plocha píku a jejich interních standardů. Získané data byla zpracována a vyhodnocena za pomoci počítačového softwaru – RapidFire Integrator a převedena do programu Excel.

Tabulka 5 – Kompletní data pro látku LEM00129909 získané při analýze plazmatické stability

Čas odběru (min)	Látka LEM00129909 (581.3/248.1)				průměr	IS LEM00129910 (587.3/149)			průměr
0	564440	572160	518880	551827		70620	66180	68840	68547
15	512900	509360	476660	499640		77220	66280	65060	69520
30	463740	473380	474580	470567		67080	63060	58400	62847
60	466040	462060	458800	462300		71300	55740	59360	62133
120	452700	505640	449120	469153		59800	57700	55180	57560

Studovaná látka s IS				průměr	SD	SD %	
0	7,993	8,646	7,537	8,059	0,557	6,911	<b>100</b>
15	6,642	7,685	7,326	7,218	0,530	7,341	<b>89,56749</b>
30	6,913	7,507	8,126	7,515	0,607	8,072	<b>93,26098</b>
60	6,536	8,290	7,729	7,518	0,895	11,910	<b>93,29642</b>
120	7,570	8,763	8,139	8,158	0,597	7,315	<b>101,2287</b>

### 5. 6. 1 Statistické hodnocení dat

Výsledná data byla statisticky vyhodnocena za pomoci programu Statistica, kdy byla vypočítána statistická významnost s použitím neparametrického testu Man-Whitney U test. Za statisticky významné jsou považovány rozdíly s korigovanými hodnotami  $p < 0,05$ . V doložených grafem různých stabilit jsou jako chybové úsečky použity směrodatné odchylky.

## 6 Diskuse

V dnešní době se klade velký důraz na urychlený vývoj nových léčiv. Nicméně se jedná o velmi nákladný proces. Je to způsobeno zejména prací spojenou s vyhledáváním nových struktur či preklinickým a klinickým testováním kandidátních léčiv. Pokud látka projde složitým procesem testování je zavedena na trh. Pouze zlomek kandidátních struktur je takto úspěšně zařazena do terapeutického procesu (Starobová *et al.*, 2006).

Triterpeny mají velký potenciál zejména díky svým rozličným biologickým aktivitám, mezi které můžeme zařadit protizánětlivé, antimalarické, antibakteriální či antimykotické vlastnosti. Avšak nejdůležitější je pro nás studium jejich protinádorové aktivity (Hodoň *et al.*, 2022). Avšak triterpeny i přes jejich nízkou toxicitu jsou značně málo připuštěny do klinického testování v důsledku horších farmakokinetických výsledků, než je pozorováno u současných léčiv na trhu. Proto je snaha vytvořit nové struktury derivátů triterpenů s lepšími farmakologickými vlastnostmi (Pokorný, 2018). Tato diplomová práce studuje nově vzniklé deriváty triterpenů v rámci preklinického testování. Látky byly syntetizovány skupinou pod vedením pana doc. RNDr. Milana Urbana, Ph. D. z Katedry organické chemie, PřF a UMTM, LF UPOL a jsou vedeny pod svými LEM kódy Chemické knihovny UMTM (LEM00018315, LEM00129910 a LEM00129909) a nejsou zveřejněny jejich struktury, jelikož doposud nejsou nově vzniklé látky patentovány a publikovány.

Nové struktury triterpenů mají potenciál projít všemi částmi testování, i když v této práci kandidátní struktury triterpenů nevykazovaly vhodné výsledky pro preklinické testování z důvodů horších výsledků stabilit a permeability. Dle výsledků Borková *et al.*, 2020, však určité testované struktury triterpenů staly vhodnými kandidáty jako léky proti rakovině. Tyto látky vykazovaly dobré výsledky v oblasti testování stabilit a byly zjištěny, že spouští apoptózu prostřednictvím vnitřních drah. Mezi struktury zařazené mezi vhodné kandidáty léčiv v práci Borková *et al.*, 2020 jsou kyselina betulinová, dihydrobetulinová, ursolová a oleanolová, které jsou modifikovány různými činidly (CuBr<sub>2</sub>, EtOAc, MeOH) za určitých podmínek (laboratorní teplota). Podobně tomu bylo i v případě práce Hodoň *et al.*, 2022, kde analyzovaly struktury triterpenoidních pyrazinů a pyridinů, kde bylo vybráno pouze malé množství struktur s velmi dobrými výsledky stabilit i cytotoxickou aktivitou.

Experimentální část byla zaměřena na analýzu ADME *in vitro* metod charakterizující preklinické testování nových kandidátních léčiv. Byly využity metody stanovující stabilitu látek, vazbu na plazmatické proteiny (RED test) a v neposlední řadě metoda analyzující propustnost látek přes uměle vytvořenou membránu za pomoci difúze (PAMPA). Získané výsledky z experimentální části jsou obsaženy v níže uvedené tabulce č. 6, která zobrazuje všechny části ADME testování.

Nejprve byla provedena chemická stabilita v prostředí fosfátového roztoku. Výsledky udávají velmi špatné hodnoty stability. Tyto výsledky u všech tří studovaných triterpenů mohou být způsobené prostřednictvím neenzymatických procesů. Mezi takové můžeme zařadit například hydrolýzu, oxidace či světlem katalyzovaná degradace. Právě tyto procesy jsou iniciovány různými fyzikálně-chemickými faktory jako je pH pufru s dalšími složkami – kovy, enzymy, světlo, teplo, vlhkost či kyslík. V případě, že látka vykazuje určitou nestabilitu může to být i problémem vazby studovaných sloučenin na používané plasty, proto je nutné test někdy zopakovat s využitím skleněných nádob namísto plastových. Dalším vysvětlením špatné chemické stability může být schopnost agregace a dimerizace triterpenů. (Medvedíková *et al.*, 2021)

Plazmatická stabilita studovaných látek se zabývala otázkou náchylnosti k hydrolýze způsobenou enzymy obsažených v lidské plazmě. V tomto případě testování triterpenů byla zjištěna dobrá stabilita, více jak 85 %. Stanovení, zdali je studovaná látka stabilní v plazmě je velmi důležitým krokem. Zajímá nás, jestli je zachováno množství potencionálního léčiva, aby bylo dosaženo požadovaného účinku. Některé látky jsou náchylnější k hydrolýze plazmatickými enzymy více než jiné, například struktury obsahující esterové nebo amidové skupiny. Výsledná nestabilita má vliv také na poločas rozpadu související se špatnou účinností. Nicméně plazmatická nestabilita může být i žádaná v případě testování proléčiv (Medvedíková *et al.*, 2021, Hodoň *et al.*, 2022).

S plazmatickou stabilitou souvisí vazba studované látky na plazmatické proteiny. V experimentální části byla zjištěna vysoká míra vázané frakce za pomoci dialýze přes polopropustnou membránu (RED test). Hodnota vázané frakce byla vyšší, než hodnota 97 %. Pokud je látka navázaná na plazmatické proteiny, může být ovlivněna jeho distribuce a s tím související účinek. Mezi takové bílkoviny nacházející se v plazmě, které dokážou vázat léčiva, patří albuminy, lipoproteiny či globuliny. Pro správnou distribuci je důležitá právě volná frakce, která dokáže prostoupit až do místa účinku.

V případě mikrosomální stability se jedná o velmi důležitou část preklinického testování, jelikož se zaměřujeme na metabolismus potencionálních léčiv. Studované látky byly po sledu výpočtů zařazeny do kategorií charakterizující rychlost eliminace za určitý čas – nízká ( $< 8,6$ ), střední a vysoká ( $> 47$ ) vnitřní clearance. Dle výsledků studovaných triterpenů (LEM00129910 –  $c_{Lint} = 15,6 \pm 2,4$   $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ ; LEM00129909 –  $c_{Lint} = 22,4 \pm 0,4$   $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ ; LEM00018315 –  $c_{Lint} = 21,4 \pm 1,2$   $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ ) byly všechny látky kategorizovány se středně vysokou vnitřní clearancí. V této diplomové práci byly využity lidské jaterní mikrosomy, avšak v práci Wu *et al.*, 2012 popisuje testování v přítomnosti myších, potkaních psích či opičích jaterních mikrosomálních frakcí. Testování v přítomnosti mikrosomů rozličných druhů poskytuje informace o rozdílech mezi druhy a tím můžeme predikovat chování takového léku u lidí. Práce Di *et al.*, 2012 zmiňuje použití hepatocytů namísto mikrosomů. V případě látek metabolizovaných prostřednictvím CYP jsou výsledky vnitřní clearance u mikrosomů a hepatocytů srovnatelné. Avšak v případě metabolizace jinými procesy než CYP (například UGT) byla vnitřní clearance rychlejší u hepatocytů, než je tomu u mikrosomů. Avšak hepatocyty jsou dražší alternativou oproti mikrosomům s kratší životností, a proto se používají v pozdních fázích testování léčiv při analyzování menšího počtu struktur.

Simulace pasivní propustnosti sloučenin přes uměle syntetizovanou polopropustnou membránu byla provedena prostřednictvím testu PAMPA. Jedná se o nebuněčnou metodu, která představuje fázi absorpce léčiv u lidí (Balimane *et al.*, 2006). Výsledky testu PAMPA jsou podstatné, jelikož k pasivní difúzi dochází zejména v GIT nebo v mozku. Studované triterpeny v této práci vykazovaly nízkou propustnost přes membránu ( $\log P_{app} < -5$ ). Výsledek nízké propustnosti souvisí s tím, že látka má pravděpodobně nižší distribuci po organismu. Propustnost však není ovlivňována pouze pasivní difúzí, ale ovlivňuje ji i aktivní transport, který není ale analyzován prostřednictvím testu PAMPA (Medvedíková *et al.*, 2021; cypotex [URL1]). V případě práce Borková *et al.*, 2020, která testovala mimo jiné modifikovanou strukturu kyseliny oleanolové, která prošla testem stabilit, nicméně také byla zařazena do kategorie s nízkou schopností prostupovat membránami. I přes tyto výsledky nebyla látka vyřazena z testování, jelikož je možnost existence dalších mechanismů transportu látek do buňky. I v případě práce Hodoň *et al.*, 2022, studované triterpeny vykazovali nízkou permeabilitu, i přes výborné výsledky u chemické, plazmatické i mikrosomální stability. Zde však byla snaha změnit struktury tak, aby byla docílena lepší permeabilita látek.

Tabulka č. 6 – Kompletní výsledky ADME testování u studovaných kandidátních triterpenů-

Studované látky pod svými LEM kódy	Metabolismus							Vazba na plazmatické proteiny	Permeabilita	
	<i>in vitro</i>							<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>	
	Chemická stabilita		Plazmatická stabilita		Mikrosomální stabilita			Rapid Equilibrium dialysis	PAMPA	
	Čas (min)	Zbývající látka (%)	Čas (min)	Zbývající látka (%)	Čas (min)	Zbývající látka (%)	Vnitřní clearance (Cl <sub>int</sub> )	Vázaná frakce (%)	log Papp	Kategorie
LEM00018315	0	100	0	100	0	100	STŘEDNÍ	97,37	-8,134	NÍZKÁ
	15	98	15	101	15	99				
	30	82	30	87	30	69				
	60	66	60	96	60	56				
	120	54	120	105						
LEM00129909	0	100	0	100	0	100	STŘEDNÍ	98,45	-9,185	NÍZKÁ
	15	81	15	90	15	102				
	30	89	30	93	30	82				
	60	70	60	93	60	52				
	120	34	120	101						
LEM00129910	0	100	0	100	0	100	STŘEDNÍ	98,42	-8,881	NÍZKÁ
	15	101	15	100	15	106				
	30	87	30	90	30	86				
	60	78	60	83	60	66				
	120	57	120	87						



## 7 Závěr

V experimentální části byly vyhodnoceny testy stability u studovaných triterpenů. Dle výsledků je zřejmé, že u všech testovaných látek byla stanovena velmi špatná chemická stabilita ve fosfátovém pufru pravděpodobně v důsledku působení neenzymatických procesů. V případě mikrosomální stability byly studované látky po výpočtech zařazena mezi látky se střední vnitřní clearance. V dalším testování těchto triterpenů by proto mohly být zařazeny stabilní studie hepatocytů nebo HepaRG buněk pro zahrnutí II. fáze metabolismu látek. Spousta dnes terapeuticky využívaných léčiv je zařazena do kategorií s vysokou clearance, jako je nimodipin, morfin, různá chemoterapeutika (doxycyklin či vinkristin) nebo verapamil. Výsledky plazmatické stability byly velmi dobré, avšak studované látky vykazovaly vysokou vazbu na plazmatické proteiny. Při studiu permeability prostřednictvím metody PAMPA přes uměle vytvořenou membránu tyto látky neposkytovaly dobré výsledky. U všech byla kategorizována nízká schopnost prostupnosti přes membrány za pomoci difúze. Nicméně byl hodnocen pouze pasivní transport, proto ke zjištění zastoupení aktivního transportu a „uptake“ musí být provedeny další experimenty na buňkách, např. linie Caco-2. Dle výsledků je zřejmé, že bude potřeba dalších ADME parametrů k určení, zdali jsou látky vhodnými kandidáty na léčivo. Pokud by i nadále poskytovaly studované látky triterpenů špatné výsledky a jevíly se jako nevhodné, nebyly by zařazeny mezi vedoucí kandidáty na léčiva. Avšak díky získaným výsledkům studovaných triterpenů může být vylepšena struktura molekul tak, aby bylo docíleno požadovaných farmakologických účinků v rámci preklinického vývoje a mohla se tak stát léčivem využívající se v rámci terapeutického použití.

## 8 Literatura

**Al-Karawi, Dheyaa Hussein (2016).** "The Investigation of The Electrical Control of Hemimicelles and Admicelles on Gold for Analyte Preconcentration."

**Almarie, Ahmed Abdulwahid Ali (2020).** "Roles of terpenoids in essential oils and its potential as natural weed killers: recent developments." *Essential Oils-Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications* : 189-210.

**Almarie, Ahmed. (2020).** Roles of Terpenoids in Essential Oils and Its Potential as Natural Weed Killers: Recent Developments. 10.5772/intechopen.91322.

**Anzenbacher P. Anzenbacherová E. (2001)** Cytochrome P450 and metabolism of xenobiotic. *Life Sci*, 58:737-747

**Avdeef, Alex (2005).** "The rise of PAMPA." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 1.2: 325-342.

**Avdeef, Alex, Mária A. Deli & Winfried Neuhaus (2015).** "In vitro assays for assessing BBB permeability: artificial membrane and cell culture models." *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs*: 188-237.

**Balíková, Marie (2004).** Forezní a klinická toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření. Galén.

**Balimane P. V., Han Y. H., Chong S. (2006):** Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. *AAPS J.* 8:E1-13.

**Balimane, Praveen V., Yong-Hae Han, Saeho Chong (2006).** "Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction." *The AAPS journal* 8.1: 1.

**Borková L., Frydrych I., Jakubcová N., Adámek R., Lišková B., Gurská S., Medvedíková M., Hajdúch M., Urban M. (2020):** Synthesis and biological evaluation of triterpenoid thiazoles derived from betulonic acid, dihydrobetulonic acid, and ursonic acid. *Eur J Med Chem.* 185:111806.

**Borkova, L., Frydrych, I., Jakubcová, N., Adamek, R., Lišková, B., Gurská, S., ... & Urban, M. (2020).** Synthesis and biological evaluation of triterpenoid thiazoles derived from betulonic acid, dihydrobetulonic acid, and ursonic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 185, 111806.

**Burtis, C., Ashwood, E., & Bruns, D. (2006).** Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4. vydání. St. Louis, Mo : Elsevier Saunders, . 2412 s. s. 1237-1247. ISBN 978-0-7216-0189-2.

**Cabrera-Pérez, M. Á., Bermejo-Sanz, M., González-Álvarez, M., González-Álvarez, I., Lara, V. V., & Kam, W. H. C. (2024).** Importance and applications of cell-and tissue-based in vitro models for drug permeability screening in early stages of drug development. In *Concepts and models for drug permeability Studies* (pp. 5-41). Woodhead Publishing.

**Camel Valérie (2003).** "Solid-phase extraction." *Comprehensive Analytical Chemistry* 41: 393-457.

**Cook, D. J., Finnigan, J. D., Cook, K., Black, G. W., & Charnock, S. J. (2016).** Cytochromes P450: history, classes, catalytic mechanism, and industrial application. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 105, 105-126, ISBN 9780128048252

**Cottrell, L. D., Griffin, R. J., Jimenez, J. L., Zhang, Q., Ulbrich, I., Ziemba, L. D., ... & Talbot, R. W. (2008).** Submicron particles at Thompson Farm during ICARTT measured using aerosol mass spectrometry. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 113(D8).

**Dahlgren, David & Hans Lennernäs (2022).** "Oral drug delivery, absorption and bioavailability.": 406-437.

**Dass, Chhabil (2007).** *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons.

**De Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007).** *Mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons.

**Di, L., Keefer, C., Scott, D. O., Strelevitz, T. J., Chang, G., Bi, Y. A., ... & Obach, R. S. (2012).** Mechanistic insights from comparing intrinsic clearance values between

human liver microsomes and hepatocytes to guide drug design. *European journal of medicinal chemistry*, 57, 441-448.

**DOSTÁLEK, Miroslav (2006).** *Farmakokinetika*. Praha: Grada, ISBN 80-247-1464-7.

**Downard, Kevin (2007).** *Mass spectrometry: a foundation course*. Royal Society of Chemistry.

**Dressman J. B., Thelen K., Jantratic E. (2008):** Towards quantitative prediction of oral drug absorption. *Clin Pharmacokinet.*47:655-67

**Džubák P., Hajdúch M., Vydra D., Šarek J., Cwierka K. (2004):** Biologické účinky triterpenoidů: protizánětlivé, antimikrobiální, hepatoprotektivní, analgetické a další farmakologické aktivity. *Klin Farmakol Farm.* 18(2):96-101.

**El-Aneed, A., Cohen, A., & Banoub, J. (2009).** *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers*. In *Applied Spectroscopy Reviews* (Roč. 44, Issue 3, s. 210–230). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>

**Fantini, Jacques & Nouara Yahi (2015).** *Brain lipids in synaptic function and neurological disease: clues to innovative therapeutic strategies for brain disorders*. Academic Press,.

**Friedecký, D. & K. Lemr (2012).** "Úvod do hmotnostní spektrometrie." *Klinická biochemie a metabolismus* 20.41: 152-157.

**Gross, Jürgen H. (2006).** *Mass spectrometry: a textbook*. Springer Science & Business Media

**Guilhaus, M., Mlynski, V., & Selby, D. (1997).** Perfect timing: time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 11(9), 951-962.

**Hajdúch, Marián, Petr Džubák, & Jan Šarek (2005).** "Biologické účinky triterpenoidů: protinádorová aktivita." *Klinická farmakologie a farmacie* 18.1: 14-21.

**Hedaya, M. A. (2012).** *Basic pharmacokinetics*. CRC Press.

**Hennion, Marie-Claire (1999).** "Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography." *Journal of chromatography A* 856.1-2: 3-54.

**Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, Ng KF, Suen MW, Tai HL (2003).** Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev.*;24(1):3-12. PMID: 18568044; PMCID: PMC1853331.

**Ho, C. S., Lam, C. W. K., Chan, M. H., Cheung, R. C. K., Law, L. K., Lit, L. C. W., ... & Tai, H. (2003).** Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical Biochemist Reviews*, 24(1), 3.

**Hodoň, J., Frydrych, I., Trhlíková, Z., Pokorný, J., Borková, L., Benická, S., ... & Urban, M. (2022).** Triterpenoid pyrazines and pyridines–Synthesis, cytotoxicity, mechanism of action, preparation of prodrugs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 243, 114777.

**Chavda, Vivek P. & Dhaval Shah (2017).** "Self-emulsifying delivery systems: one step ahead in improving solubility of poorly soluble drugs." *Nanostructures for cancer therapy*. Elsevier, 653-718.

**Ingelman-Sundberg M, Sim SC (2010).** Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochem Biophys Res Commun*. May 21;396(1):90-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.162. PMID: 20494117.

**Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (Eds.). (2004).** *Basic & clinical pharmacology*.

**Kertys, Martin (2021).** *Základy všeobecné farmakologie*. Grada Publishing.

**Klingenberg, Martin (1958).** Pigments of rat liver microsomes. Online. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, roč. 75, č. 2, s. 376-386. ISSN 00039861. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(58\)90436-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(58)90436-3). [cit. 2024-04-15].

**Lemr, K. & L. Borovcová (2020).** "Chemická ionizace." *Chemické listy* 114.3: 163-168.

**Lincová Dagmar, Hassan Farghali et al. (2007).** *Základní a aplikovaná farmakologie 2., dopl. a přepracované vydání*, Praha Galén, xxiv, 672 s. : ISBN:978-80-7262-373-0

**Martínková Jiřina (2007).** *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing, ISBN 978-80-247-1356-4.

**Martínková Jiřina (2018).** *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. 2., zcela přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada Publishing, ISBN 9788024741574.

**Medvedíková, Martina, Alejandro Carazo & Barbora Lišková (2021).** "Study of absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADME) properties of a new drug candidates in pre-clinical development." *LABORATORY TECHNIQUES IN CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE*: 325.

**Mihaljevič, Martin, Ladislav Strnad, Ondřej Šebek (2004).** "Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii." *Chemické listy* 98.3: 123-130.

**Munson, Burnaby (2000).** "Development of chemical ionization mass spectrometry." *International Journal of Mass Spectrometry* 1.200: 243-251.

**Ötles, Semih & Canan Kartal (2016).** "Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples." *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 15.1: 5-15.

**Pokorný J., Borková L., Urban M. (2018):** Click Reactions in Chemistry of Triterpenes - Advances Towards Development of Potential Therapeutics. *Curr Med Chem.* 25(5):636-658.

**Prasain, Jeevan (2012).** "Ion fragmentation of small Ion fragmentation of small molecules in mass spectrometry."

**Ridgway, K., Lalljie, S. P. D., Smith, R. M. (2008).** Microextraction methods in food analysis. In S. Otles (Ed.), *Handbook of food analysis instruments*. Boca Raton: Taylor and Francis, NW.

**Satoskar, R. S., & S. D. Bhandarkar (2020).** *Pharmacology and pharmacotherapeutics*. Elsevier India.

**Sharma, P., Patel, N., Prasad, B., & Varma, M. V. (2021).** *Pharmacokinetics: theory and application in drug discovery and development*. *Drug Discovery and Development: From Targets and Molecules to Medicines*, 297-355.

**Sharma, P., Patel, N., Prasad, B., Varma, M.V.S. (2021).** *Pharmacokinetics: Theory and Application in Drug Discovery and Development*. In: Poduri, R. (eds) *Drug Discovery and Development*. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-5534-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-15-5534-3_11)

**Simpson AE (1997).** The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol*, doi: 10.1016/s0306-3623(96)00246-7. PMID: 9068972.

**Slíva, Jiří & Votava, Martin (2011).** *Farmakologie. Lékařské repetitorium.* Praha: Triton, ISBN 978-80-7387-500-8.

**Součková L. & Rychlíčková J. (2023).** *Vybrané kapitoly z klinické farmakologie,* Masarykova univerzita

**Soural, M., Hodon, J., Dickinson, N. J., Sidova, V., Gurska, S., Dzubak, P., ... & Urban, M. (2015).** Preparation of conjugates of cytotoxic lupane triterpenes with biotin. *Bioconjugate Chemistry*, 26(12), 2563-2570.

**Starobová, O., Landa, L., Nováková, J., & Šulcová, A. (2006).** Výzkum nových léčiv od zrodu k registraci. *Czech Republic*, 44.

**Švihovec, Jan, Jan Bultas, Pavel Anzenbacher, Jaroslav Chládek, Jan Příborský, Jiří Slíva & Martin Votava (2018),** ed. *Farmakologie. Ilustroval Miroslav BARTÁK.* Praha: Grada Publishing, ISBN 9788024755588.

**Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., & Osbourn, A. (2014).** Triterpene biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 65, 225-257.

**Tripathi, K.D. (2013)** *Essentials of Medical Pharmacology.* 7th Edition, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd., New Delhi, 816-835.

**Veach B. T., Mudalige T. K., Rye P. (2017):** RapidFire mass spectrometry with enhanced throughput as an alternative to liquid-liquid salt assisted extraction and LC/MS analysis for sulphonamides in honey. *Anal. Chem.* 89, 3256-60.

**Volný, M. (2020).** Kvantitativní analýza s využitím hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy*, 114(3), 179-186.

**Volný, Michael. (2020):** „Kvantitativní analýza s využitím hmotnostní spektrometrie.“ *Chemické listy* 114.3 179-186.

**Vrobel, I., D. Friedecký & T. Adam (2018).** "Analytický systém online extrakce na pevné fázi ve spojení s tandemovou spektrometrií a jeho klinické využití."

**Wu, X., Wang, J., Tan, L., Bui, J., Gjerstad, E., McMillan, K., & Zhang, W. (2012).** In vitro ADME profiling using high-throughput rapidfire mass spectrometry: cytochrome

p450 inhibition and metabolic stability assays. *Journal of biomolecular screening*, 17(6), 761-772.

**Xu, Ran; Fazio, Gia C.; Matsuda, Seiichi P.T. (2004).** "On the origins of triterpenoid skeletal diversity". *Phytochemistry*. 65 (3): 261 - 291

**Yin R, Li T, Tian JX, Xi P, Liu RH (2018).** Ursolic acid, a potential anticancer compound for breast cancer therapy. *Crit Rev Food Sci Nutr.*; 58(4): 568-574.

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

**Żwir-Ferenc, Agata & Marek Biziuk (2006).** "Solid Phase Extraction Technique--Trends, Opportunities and Applications." *Polish Journal of Environmental Studies* 15.5

#### **Internetové zdroje:**

URL1. **CYPROTEX** – In vitro ADME [Online]. Dostupné na: <https://www.cyprotex.com/admepk> (cit. 22.04.2024)

URL2. **AGILENT TECHNOLOGIES.** RapidFire 400 [online]. [cit. 3.2.2024]. Dostupný na <https://www.agilent.com/en/product/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-instruments/high-throughput-lc-ms/rapidfire-400>

URL3. **AGILENT TECHNOLOGIES.** RapidFire® High-throughput MS technology [online]. [cit.3.2.2024]. Dostupný na [https://www.chem-agilent.com/pdf/HP\\_Presentation\\_Sept\\_2011.pdf](https://www.chem-agilent.com/pdf/HP_Presentation_Sept_2011.pdf)

URL4. **FDA.** Development and validation of a RapidFire-MS/MS method for screening of nitrosamine carcinogen impurities N-Nitrosodimethylamine (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA), NNitrosodibutylamine (NDBA) and N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA) in ARB drugs [online]. [cit. 3.2.2024]. Dostupný na <https://www.fda.gov/media/125477/download>

URL5. **Trejtner František (2016).** Základní mechanismy transportu léčiv v organismu [online]. [cit. 3.2.2024] Dostupný na <http://www.remedia.cz/Clanky/Farmakologie-pro-kliniku/Zakladni-mechanismytransportu-leciv-v-organismu/6-1GB-2ah.magarticle.aspx>