

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Diplomová práce

2009

Bc. Věra JEŽKOVÁ

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

STANOVENÍ PREDNISOLONU PO ŠTĚPENÍ
POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Věra Ježková
VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Petra Bajerová, Ph.D.

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FAKULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

**THE DETERMINATION OF
PREDNISOLONE AFTER THE CLEAVAGE
OF POLYMER CONJUGATES**

THESIS

AUTHOR: Bc. Věra Ježková

SUPERVISOR: Ing. Petra Bajerová, Ph.D.

2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Věra JEŽKOVÁ**

Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Stanovení prednisolonu po štěpení polymerních konjugátů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Proveďte literární rešerši zaměřenou na stanovení steroidních léčiv (prednisolonu) a jejich konjugátů, popište štěpení těchto konjugátů.
2. V experimentální části nalezněte vhodné podmínky pro stanovení prednisolonu po štěpení různých konjugátů (spojky, struktura PEG) chromatografickými technikami a vypracované metody ověřte na reálných vzorcích.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte a porovnejte se současným stavem v oboru.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Petra Bajerová, Ph.D.

Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce:

doc. Ing. Karel Ventura, CSc.

Katedra analytické chemie

Ostatní konzultanti:

Ing. Bohuslav Dvořák

Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**

Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem ve své práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na mou práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6.5.2009

.....
Bc. Věra Ježková

Děkuji vedoucí své diplomové práce Ing. Petře Bajarové, Ph.D. a konzultantům doc. Ing. Karlu Venturovi, CSc. a Ing. Bohuslavu Dvořákovi za všestrannou pomoc, cenné rady a za praktické připomínky, které mi poskytovali v průběhu mé diplomové práce. Také děkuji Bc. Elišce Bílkové za významnou pomoc při zpracovávání a vyhodnocování naměřených dat.

Zároveň děkuji svým rodičům, kteří mi umožnili vystudovat a byli mi po celou dobu mého studia oporou.

Souhrn

Konjugáty poly(ethylenglykolu) (PEGu) s prednisolonem mohou být působením specifických enzymů štěpeny na volný prednisolon a zbylý nosič - PEG. Enzym jaterní esteráza působí na esterové vazby sloučenin, které spojují prednisolon a PEG. Zvolením vhodné spojky lze ovlivňovat farmakokinetické vlastnosti proléčiv. Cílem této diplomové práce bylo sledovat enzymatické štěpení polymerních konjugátů s různými spojkami.

Teoretická část diplomové práce je věnována základním informacím o hormonech, steroidních hormonech a možnostech jejich stanovení. Dále obsahuje obecné poznatky o enzymech, poly(ethylenglykolech) a jejich konjugátech s léčivými a principiálně popisuje metodu HPLC ve spojení s UV detekcí.

Použité chemikálie, přístroje a postupy práce jsou uvedeny v experimentální části diplomové práce. Výsledková část obsahuje dosažené výsledky, které jsou zde diskutovány.

Klíčová slova: prednisolon
enzym
HPLC/UV
Poly(ethylenglykol)

Summary

Conjugate of poly(ethyleneglycol) with prednisolone may be cleavage by specific enzymes to free prednisolone and waste transferring agent - PEG. Liver esterase enzyme effects on ester bond of compound, linking prednisolone and PEG. Select the appropriate coupling can influence the pharmacokinetic properties of drugs. The aim of this thesis was to monitor the enzymatic cleavage of various conjugates with various connections.

The theoretical part of thesis is devoted to basic information on hormones, steroid hormones and the possibilities of their determination. It also includes a general knowledge of the enzymes, polyethyleneglycol and its conjugates with drugs and describes the principle method of HPLC combined with UV detection

The used chemicals, apparatus and procedure are given in the experimental part of thesis. Results part contains the adjusted results which are also discussed.

Keywords: prednisolone
enzyme
HPLC/UV
poly(ethyleneglycol)

Seznam použitých zkratek

ALP	Alkalická fosfatáza
ALT	Alaninaminotransferáza
AMK	Aminokyselina
AST	Aspartátaminotransferáza
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	Hovězí sérový albumin
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
E	Enzym
ELISA	Heterogenní enzymová imunoanalýza
FIB	Ionizace urychlenými ionty
HRE	Hormon-responsivní element
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I.D.	Vnitřní průměr
IEC	Iontově výměnná chromatografie
IR	Infračervené záření
K_M	Michelisova konstanta
mPEG	Methoxypoly(ethylenglykol)
mRNA	Messenger ribonukleová kyselina
MS	Hmotnostní spektrometrie
NAD⁺	Nikotinamidadenindinukleotid
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
P	Produkt
PDA	Diodové pole
PEG	Poly(ethylenglykol)
PLE	Prasečí jaterní estereáza
P_x	Peroxidáza

RP-HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
S	Substrát
SELDI	Ionizace laserem za účasti povrchu pevných částic
SLE	Systemový lupus erythematoses
sPEG	Star poly(ethylenglykol)
UV	Ultrafialové záření
VIS	Viditelné záření

2.3.2	Stabilita a toxicita	33
2.3.3	Modifikace PEGem	34
2.3.4	Farmakokinetické vlastnosti PEGu	34
2.3.5	Další využití PEGu	35
2.4	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)	36
2.4.1	Instrumentace v HPLC	36
2.4.1.1	Kolony pro HPLC	37
2.4.1.2	Stacionární fáze	38
2.4.1.3	Mobilní fáze	39
2.4.1.4	Detektory	39
2.4.2	Spojení HPLC/UV	39
2.5	Spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti (UV – VIS)	40
2.5.1	Instrumentace v UV – VIS spektrometrii	41
2.5.1.1	Detektory pro UV – VIS spektrometrii	41
3	Experimentální část	42
3.1	Použité chemikálie	43
3.2	Použitý standard	43
3.3	Použité konjugáty	43
3.4	Použité přístroje	45
3.4.1	HPLC/UV	45
3.4.1.1	Podmínky pro HPLC/UV	47
3.4.2	Horkovzdušný sterilizátor	47
3.5	Kalibrační řada	48
3.6	Enzymová kinetika	49
3.6.1	Měření kinetické křivky	49
3.6.2	Měření parametrů kinetické rovnice	49
4	Výsledky a diskuse	51
4.1	Výběr experimentálních podmínek	52
4.2	Kalibrační řada	53
4.3	Měření kinetické křivky	53
4.4	Měření parametrů kinetické rovnice	58
4.4.1	Vyhodnocení experimentálních dat nelineární regrese	59

4.4.2	Vyhodnocení experimentálních dat linearizací rovnice Michaelise a Mentenové	60
4.4.2.1	Vyhodnocení dat podle Lineweavera a Burka	60
4.4.2.2	Vyhodnocení dat podle Eadiea	61
4.4.2.3	Vyhodnocení dat podle Hanese	62
5	Závěr	64
	Seznam použité literatury	66

1 Úvod

Prednisolon je velmi významné glukokortikoidní léčivo s mnoha různými a důležitými účinky. Aby bylo možno jeho léčivých vlastností správně využívat, je nutné jej dopravit do organismu ve vhodné formě. Za tímto účelem může být prednisolon navázán na polymerní nosič, který dopraví léčivo v požadovaném čase na dané místo v organismu. Jedním z takovýchto nosičů je poly(ethylenglykol), který není toxický a po odštěpení léčiva je v nezměněné podobě vyloučen z organismu. Může se vyskytovat v mnoha strukturních formách, které zajistí požadované farmakokinetické vlastnosti proléčiva.

Prednisolon je s poly(ethylenglykolem) spojen uhlovodíkovou spojkou tvořenou funkčními deriváty různých dikarboxylových kyselin. Volbou kyseliny lze rovněž ovlivňovat vlastnosti proléčiva. Právě na tyto spojky působí specifické enzymy, které jsou přítomny v organismu. Enzym jaterní prasečí esteráza štěpí esterovou vazbu mezi kyselinou a prednisolonem, a tím uvolňuje léčivo z polymerního konjugátu. Prednisolon má tedy možnost působit na konkrétním místě a po určité době.

2 Teoretická část

2.1 HORMONY

Hormony jsou látky, které v mnohobuněčných organismech slouží jako chemičtí poslové a zprostředkovávají přenos signálu mezi buňkami, tkáněmi a orgány. Jsou produkovány živočichy i rostlinami a slouží k přenosu informací při růstu, tělesném i psychickém vývoji, rozmnožování a udržování homeostázy [1].

U savců jsou hormony produkovány žlázami s vnitřní sekrecí (endokrinní žlázy) a jsou vylučovány do krevního oběhu. Tímto je vytvořen endokrinní systém, který je součástí neurohumorálního systému řídicího veškeré tělesné funkce jako jsou metabolismus, růst, reprodukční funkce apod. [2].

2.1.1 Vývoj studia hormonů

Již ve středověku byly známy léčivé účinky hormonů a proto se používaly k léčbě některých onemocnění zvířecí či lidské orgány. Avšak výzkum jednotlivých žláz a jejich funkcí se datuje až do druhé poloviny devatenáctého století, kdy byly položeny základy endokrinologie [3].

Název hormon vznikl v roce 1905 a je odvozen od řeckého *hormao* čili podněcují.

Jako první byly izolovány strukturně nejjednodušší hormony jako jsou adrenalin a thyroxin, později složitější inzulin a v letech 1927-1935 většina steroidních pohlavních hormonů. Následovaly četné pokusy různých syntéz těchto hormonů. Výzkum peptidových a proteinových hormonů byl poněkud opožděn, kvůli jejich složité struktuře.

Významný pokrok znamenalo vyřešení struktury a syntézy důležitých hypofyzárních hormonů. Zároveň byla objevena a objasněna struktura a funkce tzv. hypothalamových uvolňovacích hormonů [3].

Důležitým zlomem byla příprava hormonů různými farmaceutickými firmami. Jako výchozí látky se používaly rostlinné materiály (stigmasterol a ergosterol) či steroidní látky živočišného původu (cholesterol, kyselina cholová, deoxychová atd). Peptidové hormony se syntetizovaly klasickou metodou v roztoku nebo novější Merrifieldovou metodou na pevném nosiči. Steroidní hormony bylo

možno vyrábět z přírodních zdrojů, kdy se kromě chemických reakcí využívalo i mikrobiálních transformací. Proteinové hormony se ve většině případů získávají izolací z příslušných zvířecích žláz. Velice úspěšně se vyvinula metoda genového inženýrství - rekombinace DNA, kdy bakterie s vloženou genetickou informací produkují dané peptidy či proteohormony přímo do kultivačního média [3].

2.1.2 Rozdělení hormonů

2.1.2.1 Podle chemického složení [4]

a) Hormony odvozené od aminokyseliny tyrosinu.

Do této skupiny patří hormony dřeně nadledvin (adrenalin a noradrenalin) a hormony štítné žlázy (tyroxin a trijodthyronin). Adrenalin a noradrenalin jsou zároveň mediátory nervového přenosu.

b) Hormony s peptidovou strukturou.

Vznikají skládáním jednotlivých aminokyselin do podoby jednoduchých peptidů či složitějších proteinů (proteohormony). Tyto hormony se secernují v hypothalamu a neurohypofýze.

c) Steroidní hormony.

Jejich chemická struktura je odvozena od cholesterolu a jsou vylučovány gonádami a kůrou nadledvin.

2.1.2.2 Podle mechanismu působení [5]

a) Mechanismus zprostředkovaný membránovými receptory

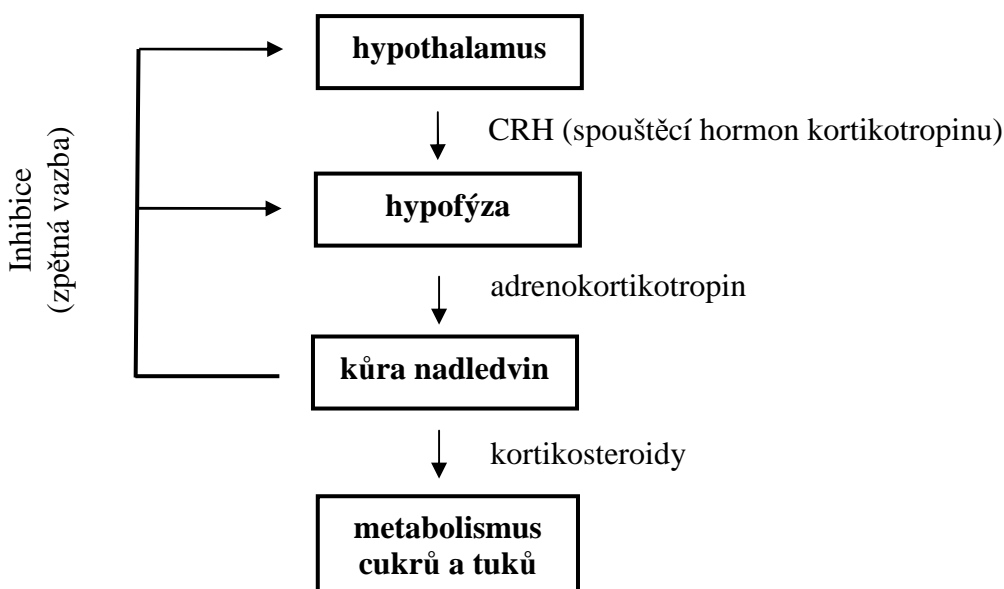
- peptidové a proteinové hormony a katecholaminy

b) Mechanismus zprostředkovaný intracelulárními receptory

- steroidní a thyroïdní hormony

2.1.3 Působení hormonů

Hormony působí na cílové buňky buď přímo, nebo ovlivňují syntézu a sekreci sekundárního hormonu, který pak účinkuje na cílovou tkáň. Nejdůležitější žlázou s vnitřní sekrecí je hypofýza (podvěsek mozkový), která působením svých hormonů ovlivňuje sekreci všech endokrinních žláz. Činnost hypofýzy je řízena hypothalamem (část mezimozku). Syntéza a sekrece veškerých hormonů závisí na různých typech zpětných vazeb. Jako příklad lze uvést řízení sekrece kortikosteroidů (hormony kůry nadledvin) (Obr. 1), které regulují metabolismus cukrů a tuků [2].



Obr. 1: Řízení sekrece hormonů [2].

Hormony působí na základě interakce se specifickým receptorem, vyskytujícím se na povrchu cílových buněk. Jejich spojením vznikne komplex hormon-receptor a spustí se jeden ze dvou primárních mechanismů působení hormonů [2].

První cesta působení hormonu je založena na aktivaci enzymu adenylátcyklázy. Hormon (první posel) se váže na plazmatickou membránu buňky a aktivuje enzym adenylátcyklázu. Tento enzym převádí adenosintrifosfát (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP), který působí jako druhý posel. cAMP pak

zprostředkovává metabolické účinky mnoha hormonů. Takto působí například katecholaminy. Tento mechanismus zaručuje rychlý nástup účinku hormonů [2,6].

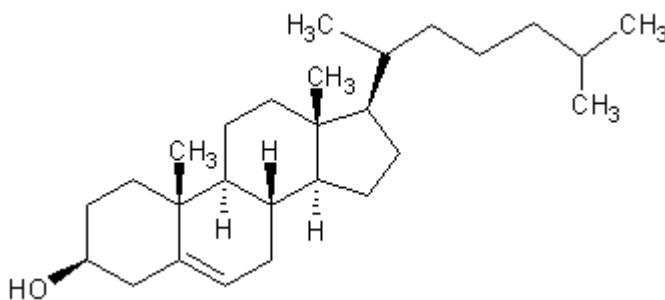
Druhým mechanismem je selektivní ovlivnění genové transkripce. Komplex hormon-receptor se váže na specifickou oblast DNA (HRE = hormon – responsivní element) a aktivuje nebo blokuje specifické geny. Tímto je ovlivněna genová transkripce DNA do mRNA, která je následně přeložena do sekvence aminokyselin. Tak vznikají specifické proteiny, které ovlivňují metabolické procesy. Tento mechanismus je pomalejší než aktivace adenylátcyklázy [2,6].

2.1.4 Steroidní hormony

Steroidní hormony jsou lipofilní látky, které jsou ve vodě rozpustné pouze ve formě esterů s kyselinou sírovou či ve formě glukuronidů nebo glykosidů.

Do této skupiny patří hormony pohlavní (gonadotropiny), a to ženské (estrogeny a gestageny) produkované převážně folikuly vaječníků a mužské (androgeny) produkované varlaty. Dále sem patří hormony produkované kůrou nadledvin (kortikosteroidy) [4].

Steroidní hormony jsou odvozeny od cholesterolu (Obr. 2) a mají cyklopentano-perhydrofenanthrenovou strukturu (steran) [4,5].



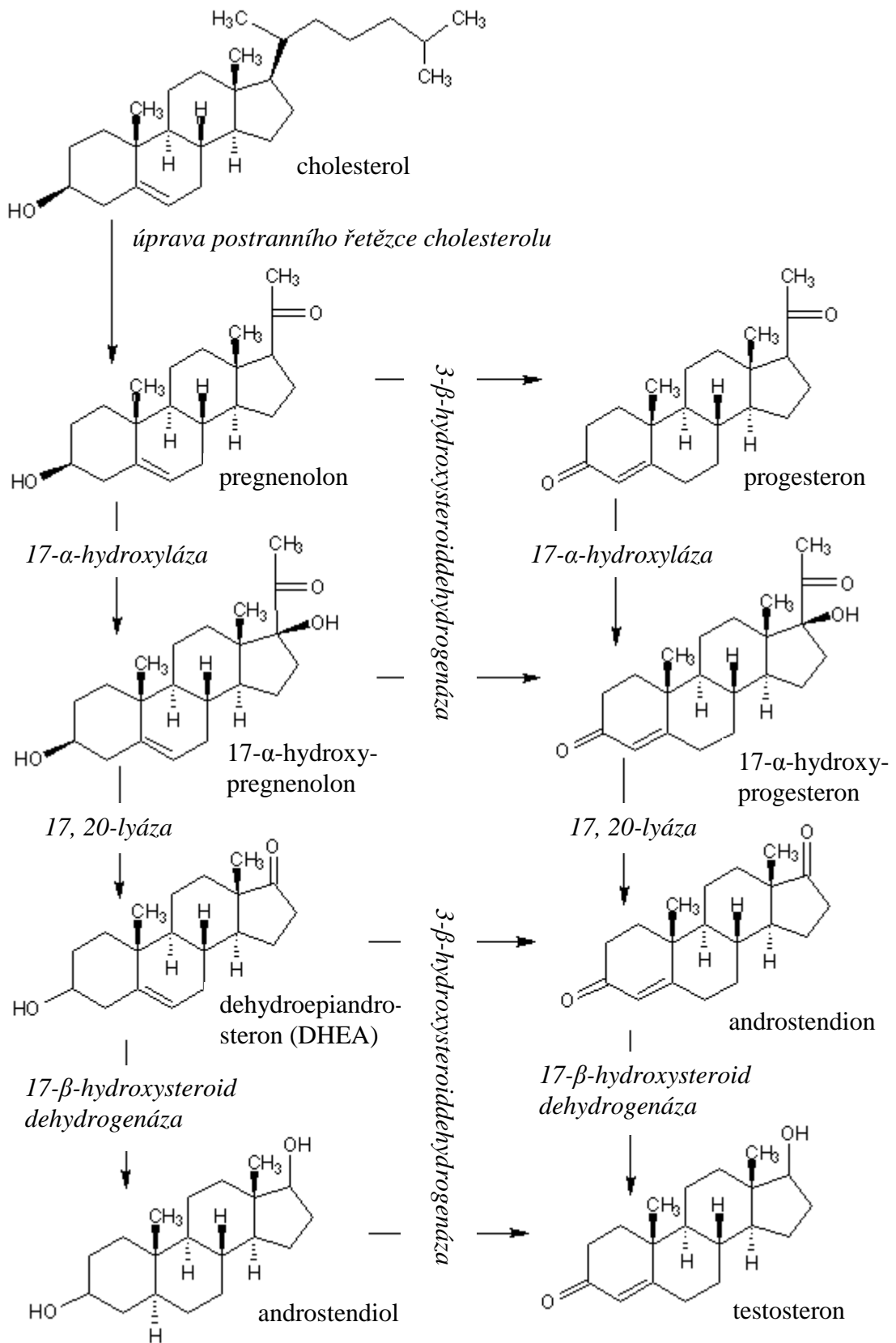
Obr. 2: Molekula cholesterolu - strukturní vzorec.

Sumární vzorec cholesterolu je $C_{27}H_{46}O$ a molekulová hmotnost je 386.654 g/mol.

2.1.4.1 Biosyntéza steroidních hormonů

Biosyntéza steroidních hormonů začíná v mitochondriích odštěpením isokaproaldehydu (C₆) z molekuly cholesterolu. Za katalýzy mitochondriálního enzymu Cytochrom P450 vzniká pregnenolon, který je prekurzorem všech steroidních hormonů (kromě kalcitriolu) [5].

Pregnenolon je za účasti enzymů dále přeměňován v endoplazmatickém retikulu či v mitochondriích na steroidní hormony a jejich prekurzory (Obr. 3).



Obr. 3: Biosyntéza steroidních hormonů [8].

2.1.4.2 Odbourávání steroidních hormonů

Steranový skelet je velmi stabilní a lze jej štěpit jen velmi obtížně. Proto dochází v játrech nebo v ledvinách k inaktivaci steroidů redukcí ketoskupin na hydroxyly (hydrogenací dvojné vazby) a následuje konjugace s kyselinou glukoronovou či s kyselinou sírovou. Vzniklé konjugáty jsou rozpustné ve vodném prostředí a mohou se tak z těla vylučovat močí (70%), stolicí a kůží. Metabolity steroidních hormonů lze stanovovat a využít je tak k diagnostice [9, 10, 11].

2.1.4.3 Rozdělení steroidních hormonů [3]

Steroidní hormony lze dělit podle různých kritérií (podle chemické struktury, místa tvorby, biologické funkce nebo biochemického efektu). Nejčastěji se dělí na:

- pohlavní hormony
 - estrogeny (ženské hormony produkované folikuly vaječníků)
 - estradiol
 - androgeny (hormony produkované mužskými pohlavními žlázami)
 - testosteron
 - gestageny (ženské hormony produkované žlutým tělískem Graafova folikulu)
 - progesteron
- nadledvinové hormony – kortikosteroidy
 - glukokortikoidy
 - kortison
 - kortikosteron
 - mineralokortikoidy
 - aldosteron

2.1.4.4 Kortikosteroidy

Kortikosteroidy, nazývané též zkráceně avšak nesprávně kortikoidy, jsou biologicky aktivní látky tvořené kůrou nadledvin. Základem jejich struktury je molekula cholesterolu se svou cyklopentano-perhydrofenanthrenovou strukturou (Obr. 2) [4].

Mezi kortikosteroidy patří:

- mineralokortikoidy
- glukokortikoidy

a) Mineralokortikoidy

zasahují do metabolismu vody a elektrolytů, řídí jejich transport a rovnováhu. Nejvýznamnějším zástupcem této skupiny je aldosteron, který zvyšuje resorpci sodíku a chloridů a snižují jejich vylučování. V organismu je extracelulární Na^+ směňován za intracelulární K^+ , čímž je udržována správná izotonie. Dalšími hormony patřícími mezi mineralokortikoidy jsou deoxykorton a kortexolon [3, 4].

b) Glukokortikoidy

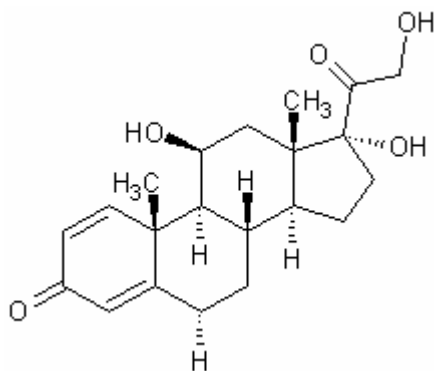
regulují především metabolismus cukrů, tuků a bílkovin. Menší měrou se účastní na regulaci vody a elektrolytů, zároveň mají katabolický účinek. Aktivují glukoneogenezi z bílkovin a tuků a zvyšují ukládání glykogenu v játrech. Do této skupiny patří kortikosteron, 11-dehydrokortikosteron a dva nejdůležitější hormony kůry nadledvin kortison a hydrokortison (kortisol). Kortison vykazuje značné protizánětlivé a antirevmatické účinky, díky čemuž se začal využívat ve zdravotnictví. Glukokortikoidy však mají i nepříznivé účinky na organismus, např. imunosupresivní. Oslabují tak reakce imunitního systému na infekční podněty. Toho lze ale dobře využít k potlačení imunitních reakcí při transplantacích [3,4]. Synteticky připraveným glukokortikoidem je prednisolon a jeho methylovaný derivát methylprednisolon.

2.1.4.5 Prednisolon

Chemický název prednisolonu je 11 β ,17,21-trihydroxy-1,4-pregnadien-3,20-dion (Obr. 4). Jedná se o bílou krystalickou látku se sumárním vzorcem C₂₁H₂₈O₅ a molekulovou hmotností 360,45 g.mol⁻¹. Prednisolon je rozpustný v alkoholu a dioxanu, špatně rozpustný v etheru, chloroformu a v dichlormethanu a téměř nerozpustný ve vodě [3, 12].

Prednisolon je kortikosteroidní léčivá látka s převážně glukokortikoidními ale i mineralokortikoidními účinky. Váže se na specifické intracelulární receptory, čímž dojde k aktivaci nebo potlačení odpovídající reakce. Je vhodný pro léčbu široké škály zánětlivých a autoimunitních onemocnění, jako jsou například astma, revmatoidní artritida, ulcerózní kolitida a Crohnova choroba, roztroušená skleróza a systémový lupus erythematodes (SLE). Dále bývá používán k potlačení imunitní odpovědi při transplantacích nebo v případech nedostatečné funkce kůry nadledvin (Addisonova choroba). Prednisolon je také významný při léčbě leukémie a různých druhů lymfomů. Může být použit i k substituční léčbě pacientů, jejichž nadledviny nejsou schopny produkovat dostatečné množství kortikosteroidů [14].

Prednisolon má na organismus také nežádoucí účinky, které jsou závislé na dávce, délce a frekvenci podávání. Dlouhodobá léčba vysokými dávkami prednisolonu může mít za následek retenci tekutin, snížení hmotnosti, zvýšení krevního tlaku, ztrátu draslíku, bolesti hlavy, svalovou slabost a otoky. Dalšími škodlivými účinky jsou růst vlasů na tváři, ztenčování cév a snadná tvorba modřin na kůži, glaukom, katarakta, peptické vředy, zhoršení cukrovky, nepravidelná menstruace, retardace růstu u dětí, křeče a psychické poruchy [14].



Obr. 4: *Strukturní vzorec prednisolonu.*

2.1.4.6 Stanovení steroidních látek

Stanovení steroidních látek nebylo jednoduché ani po poznání jejich chemické struktury. Proto byly stanovovány nejprve jejich metabolity v moči. Vysokou separační účinnost zaznamenaly chromatografické metody, zejm. plynová chromatografie. K detekci se však využívaly především optické metody (spektrofotometrie ve VIS a UV oblasti, fluorimetrie) či ionizační techniky (např. detekce pomocí elektronového záchytu nebo plameno-ionizační detekce), což znamenalo nižší citlivost. V posledních 50 letech však došlo k velkému pokroku a rozvoji nových metod [15].

Významnou metodou se na přelomu 50. a 60. let stala imunoanalýza - stanovení steroidních hormonů v séru či v plasmě na základě reakcí s vysoce specifickými protilátkami. S vývojem metod přišla radioimunoanalýza za využití izotopového značení sloučenin především ^{13}C a ^2H . Později byla vyvinuta i neizotopová imunoanalýza. Nejúčinnější se stalo využití kompetitivní analýzy, kdy značený analyt soutěží se známým množstvím standardní látky o vazebná místa protilátky. Využívány jsou různé způsoby značení a jsou zaznamenávány různé fyzikální veličiny – radioaktivita, fluorescence, enzymová aktivita, chemiluminiscence. Poté je zpracována kalibrační závislost odezvy detektoru na koncentraci analytu [15]. Imunoeseje posunuly mez detekovatelnosti až o několik řádů oproti klasickým spektrálním a později i chromatografickým metodám. To umožnilo měření prakticky všech hormonálních steroidů a biologicky významných metabolitů. Vznikl tak účinný nástroj pro diagnostiku endokrinopatií, způsobených poruchou tvorby a metabolismu steroidů [45].

V 60. letech se začalo využívat chromatografických metod, především plynové chromatografie. Hlavní výhodou je jejich vysoká separační účinnost a variabilita v použití ionizačních a detekčních technik. Velmi významnou metodou se později stala kapalinová chromatografie a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, která často slouží jako referenční metoda pro ostatní metody [15].

Velice významným oborem se stala molekulární biologie a genetika, která v 80. a 90. letech 20. století vstoupila do endokrinologie. Poznáním lidského genomu

včetně genů, které kódují enzymy steroidního metabolismu, steroidních receptorů a dalších signálních molekul, byly odhaleny důležité souvislosti steroidních enzymopatií a receptorových poruch [45].

Stanovovat steroidní hormony jako takové lze v moči, plazmě, ve vlasech či v jaterní tkáni nebo mohou být stanovovány jejich metabolity, které se vylučují převážně močí jako glukuronidy, sulfáty a nekonjugované sloučeniny.

2.2 ENZYMY

Enzymy jsou biokatalyzátory bílkovinné povahy podílející se na regulaci fyziologických procesů v organismu tak, aby byla udržena homeostáza [6].

V lidském organismu, i v té nejjednodušší buňce, je přes 3000 enzymů. Jsou netoxické a jejich účinek lze snadno regulovat. Enzymatické reakce probíhají rychleji než s jinými chemickými katalyzátory a mnohem rychleji než reakce probíhající bez katalyzátorů a to i za mírných (většinou tělesných) podmínek při teplotě kolem 37 °C, za atmosférického tlaku 0,1 MP a při neutrálním pH. Tyto reakce jsou vysoce specifické, protože enzym katalyzuje pouze jednu jedinou reakci a tvoří specifické produkty. Enzymové reakce mají málokdy vedlejší produkty [6, 16, 17].

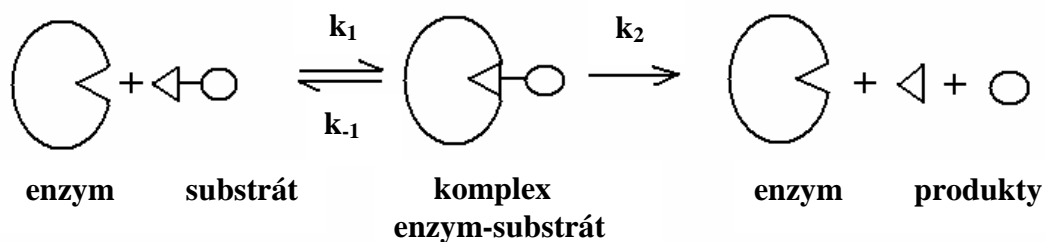
Každá molekula enzymu má na sobě místo, které je pro jeho reakci nezbytné. Toto místo se nazývá aktivní centrum enzymu, do kterého se váže molekula substrátu. Některé enzymy potřebují ke své činnosti kromě substrátu i další molekulu zvanou kofaktor nebo koenzym. Je jím termostabilní nízkomolekulární nebílkovinná část, která je pro aktivitu některých enzymů nepostradatelná. Kofaktor se nachází v aktivním centru enzymu a může jím být například kovový ion Zn^{2+} . Organická část molekuly je koenzym, například NAD^+ . Některé koenzymy jsou s molekulou enzymu spojeny přechodně nekovalentní vazbou a působí tak jako jeden ze substrátů. Stabilní kovalentní vazbou jsou vázány jiné kofaktory a prostetické skupiny.

Spojením kofaktoru s neaktivním proteinem zvaným apoenzym, vzniká katalyticky aktivní komplex enzym-kofaktor, který se nazývá holoenzym.



Často je složkou koenzymu vitamín. Nejčastěji jsou to deriváty vitamínů skupiny B. Některé organismy je neumí syntetizovat a proto je musí přijímat potravou. Při nedostatečném příjmu těchto vitamínů může dojít k poklesu aktivity enzymu [6, 17, 18].

Enzym se aktivně podílí na přeměně substrátu na produkt. Nejprve je substrát vázán v aktivním centru. Vznikne tak komplex enzym-substrát, který je přeměněn na komplex enzym-produkt. Ten se rozštěpí a enzym se uvolní v nezměněné podobě (Obr.5) [18].



Obr. 5: Schéma enzymové reakce

2.2.1 Klasifikace enzymů podle typu reakce [17, 19]

- **oxidoreduktázy** – katalyzují oxidačně-redukční reakce často s kofaktorem NAD^+ , např. dehydrogenázy v citrátovém cyklu
- **transferázy** – přenášejí funkční skupiny (např. amino-, methyl-, acetyl- nebo fosfátovou skupinu)
- **hydrolázy** – katalyzují hydrolytické štěpení chemických vazeb (za účasti molekuly vody)
- **lyázy** – štěpí chemické vazby jinak než hydrolyticky a eliminují funkční skupiny za vzniku dvojných vazeb
- **isomerázy** – katalyzují isomerizační reakce a umožňují vnitřní přestavbu molekuly
- **ligázy** – umožňují slučování molekul a tvorbu vazeb spojenou s hydrolýzou ATP

2.2.2 Regulace enzymové aktivity

Enzymová aktivita je regulována především množstvím enzymu. To se mění podle rychlosti syntézy či odbourávání buňkou, která se přizpůsobuje daným životním podmínkám.

Katalytická aktivita enzymu je závislá také na strukturních a konformačních změnách. Rychlost reakce je přímo úměrná koncentraci komplexu enzym-substrát, která se mění v závislosti na koncentraci substrátu a na afinitě substrátu k enzymu [17].

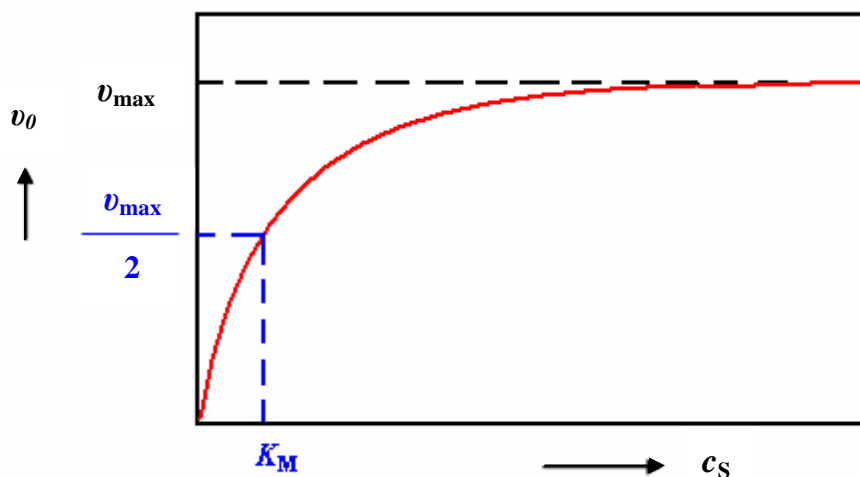
Rychlost enzymových reakcí dále závisí na koncentraci substrátu, fyzikálně-chemických vlastnostech (teplota a pH) a přítomnosti aktivátorů či inhibitorů.

Jednotkou množství enzymu je **katal** a udává katalytickou koncentraci enzymu. Je to takové množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za 1 s za definovaných podmínek (teplota, pH, přítomnost aktivátorů, úplné nasycení molekul enzymu substrátem) [18].

Rychlost enzymové reakce popisuje tzv. Michaelisova konstanta (K_M) a vyjadřuje ji rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (1)$$

Michaelisova konstanta (K_M) charakterizuje katalytické vlastnosti enzymu pro danou reakci. Je závislá na množství enzymu, množství substrátu a na reakčním prostředí (pH, teplota, přítomnost efektorů) [18]. Je to taková koncentrace substrátu, při níž probíhá enzymová reakce rychlostí, která se rovná polovině maximální možné rychlosti (v_{\max}). Hodnoty K_M se pohybují mezi 10^{-1} až 10^{-6} mol/l a čím menší je K_M , tím rychleji je substrát přeměňován na produkt [18, 19].



Obr. 6: Saturační křivka. Závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu za konstantní koncentrace enzymu [20].

2.2.3 Vyhodnocení experimentálních dat

Výpočet kinetických parametrů rovnice Michaelise a Mentenové K_M a v_{\max} lze provádět metodou počátečních reakčních rychlostí nebo z integrálních dat. Nejčastěji se používá metoda počátečních reakčních rychlostí s využitím vyhodnocení nelineární regrese a linearizovaných tvarů rovnice Michaelise a Mentenové [20].

2.2.3.1 Vyhodnocení experimentálních dat nelineární regrese

Do grafu je vynesena závislost počáteční rychlosti reakce v_0 na koncentraci substrátu c_S (konjugátu PEG-prednisolon). Získaná data jsou proložena křivkou, kterou vyjadřuje rovnice Michaelise a Mentenové (2). Z této rovnice lze získat hodnotu Michaelisovy konstanty K_M a maximální rychlosti rovnice v_{\max} [20].

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (2)$$

2.2.3.2 Vyhodnocení experimentálních dat linearizací rovnice Michaelise a Mentenové

a) Podle Lineweavera a Burka – do grafu je vynášena závislost $1/v_0$ na $1/c_S$. Je získána přímka, jejíž směrnice je K_M/v_{\max} , úsek na svislé ose je roven $1/v_{\max}$ a úsek na vodorovné ose hodnotě $-1/K_M$ [20].

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_S} \quad (3)$$

b) Podle Eadiea - z lineární závislosti v_0 na v_0/c_S je získáno K_M jako směrnice a v_{\max} jako úsek na svislé ose (úsek na vodorovné ose je v_{\max}/K_M) [20].

$$v_0 = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{c_S} \quad (4)$$

c) **Podle Hanese** - poměr c_s/v_0 je lineární funkcí koncentrace c_s . Úsek na svislé ose je roven poměru K_M/v_{\max} , úsek na vodorovné ose hodnotě $-K_M$ a směrnice je $1/v_{\max}$ [20].

$$\frac{c_s}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \cdot c_s \quad (5)$$

2.2.4 Význam enzymů v medicíně

Zvýšené nebo snížené hodnoty koncentrace enzymů mohou ukazovat na určitá onemocnění, proto se stanovují hladiny některých enzymů. Např. zvýšená katalytická koncentrace enzymu alaninaminotransferázy (ALT) je první známkou akutní hepatitidy. Aspartátaminotransferázu (AST) produkují buňky jaterní tkáně i srdečního svalu a kosterního svalstva a jeho zvýšené katalytické koncentrace mohou poukazovat na poškození jaterních buněk, na infarkt myokardu nebo onemocnění kosterních svalů [19].

V klinické biochemii mají enzymy veliký význam pro svou substrátovou a reakční specifitu a mírné podmínky reakcí. Proto je jich hojně využíváno ke stanovení některých látek, jako je např. glukóza, močovina nebo kyselina močová. Některé enzymy (alkalická fosfatáza – ALP a peroxidáza P_x) jsou také používány jako selekční značky pro imunochemické metody – ELISA [19].

Enzymy je také možno využívat pro enzymovou terapii. Jsou aplikovány např. při léčbě infarktu myokardu, aby rozpouštěly tromby na cévních stěnách, proteázy se podílí na čištění ran po chirurgických zákrocích, atd. Velký význam mají enzymy podávané v gastroenterologii při poruchách trávení [19].

2.2.5 Jaterní esteráza EC 3.1.1.1

Patří do skupiny hydroláz, které katalyzují štěpení esterových, etherových nebo amidových vazeb. Esterázy se dělí na arylesterázy, karboxyesterázy, acetylerázy a cholinesterázy [21]. Označuje se systematickým názvem karboxyleráza a katalyzuje reakci: ester karboxylové kyseliny + voda = alkohol a karboxylová kyselina [22].

Jaterní prasečí esteráza (PLE – Pig Liver Esterase) je pravděpodobně nejdůležitější karboxylerázou používanou při organických syntézách a nejčastěji katalyzuje syntézy opticky aktivních sloučenin. Nicméně při použití komerčních PLE připravených extrakcí z prasečích jater je reprodukovatelnost komplikována přítomností různých izoenzymů (α -, β - a γ -PLE). Tyto izoenzymy se liší izoelektrickým bodem, molekulovou hmotností, citlivostí vůči inhibitorům a hlavně substrátovou specifitou [23].

2.3 POLY(ETHYLENGLYKOLY) (PEGy)

2.3.1 Fyzikálně chemické vlastnosti

Poly(ethylenglykol) je polymer s obecným vzorcem $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, kde n je číslo větší nebo rovno 4. Molekulová hmotnost se pohybuje obvykle v rozmezí od 200 do 40 000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a je závislá na n . PEGy o molekulové hmotnosti 200 – 600 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ jsou čiré hygroskopické viskózní kapaliny, nad 1000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ jsou to vosky a od 5000 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ jde o bílý prášek [24, 25].

PEGy jsou dobře rozpustné ve vodě a organických rozpouštědlech, např. v ethanolu. Ochetně se rozpouští v roztocích aromatických uhlovodíků, např. benzenu, pouze nepatrně se rozpouští v diethyletheru [24, 25].

2.3.2 Stabilita a toxicita

Při skladování PEGy nehydrolyzují, nekazí se ani nepodléhají plísním. Jsou to sloučeniny s nízkou toxicitou [26, 27]. Vyšší toxicitu vykazují monomery ethylenglykolu a diethylenglykolu. Samy o sobě nejsou příliš toxické, způsobují opilství a mírné žaludeční problémy, avšak jejich odbouráváním v organismu vznikají toxické produkty (glykolaldehyd, kyselina glykolová, kyselina glyoxalová a kyselina šťavelová), které vyvolávají vznik metabolické acidózy, selhání ledvin až smrt. Klinické studie prokázaly, že diethylenglykol má kancerogenní účinky [28]. Se vzrůstajícím počtem ethoxylovaných jednotek toxicita PEGů klesá. Polymery s molekulovou hmotností nad 400 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ jsou netoxické a používají se jako aditiva v potravinách a lécích. I v testech genotoxicity se poly(ethylenglykol) prokázal jako negativní jak *in vivo* na bakteriálním kmenu *Salmonella typhimurium*, tak *in vitro* na lidských fibroblastech [24].

2.3.3 Modifikace PEGem

Výzkum PEGů začal v roce 1977 zjištěním, že po připojení PEGu na sérový hovězí albumin (BSA – Bovine Serum Albumine), dojde ke změně jeho imunologických vlastností [29]. Navázáním PEGu na protirakovinný enzym L-asparginázu mikroorganismu *Escherichia coli* vzniká PEG–L-aspargináza, která nevykazuje oproti původnímu imunogenicitu. Tato látka byla dále klinicky vyvíjena a nyní je prodávána společností Enzon pod obchodním názvem Oncaspar[®].

Pravděpodobně nejdůležitějším rysem modifikace PEGem je zvyšování poločasu života proteinů, což vede k zvyšování hladin proteinů v plazmě. Toto lze zdůvodnit zvyšováním molekulové hmotnosti konjugátů bílkovin s PEGy. To má za následek snížení vylučování těchto proteinů glomerulární filtrací v ledvinách. Dalším faktorem je vazba PEGů na proteolytické enzymy odbourávající proteiny v plazmě. Většina konjugátů PEGů (o vysokých i nízkých molekulových hmotnostech) byla syntetizována z lineárních polymerů. Nověji jsou připravovány i konjugáty s PEGy s rozvětvenou strukturou poskytující široké možnosti prostorového uspořádání [30].

2.3.4 Farmakokinetické vlastnosti PEGu

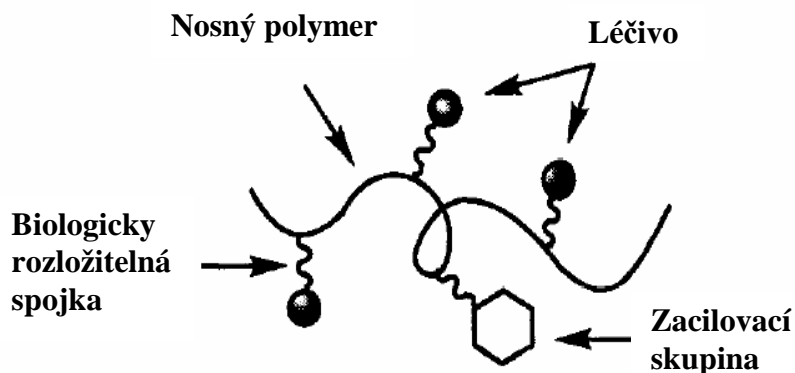
Ve farmaceutickém průmyslu se využívá konjugátů PEGů s léčivy hlavně pro jejich dobrou rozpustnost ve vodném prostředí. Provádějí se nové pokusy s cílem zvýšit rozpustnost konjugátů ve vodě a zlepšit způsob distribuce léčiv v organismu. Samotná molekula proléčiva (PEG–léčivo) je v organismu biologicky neaktivní. Je proto nutné chemické nebo enzymatické štěpení, aby došlo k aktivaci léčiva [30].

PEG našel využití v oblasti polymerních nosičů léčiv, jelikož je biokompatibilní, netoxický a dobře rozpustný ve vodném prostředí. Farmaceutické aplikace PEGu většinou spočívají ve zvýšení rozpustnosti léčiva, doby jeho cirkulace, bezpečnosti a zvyšování hladiny proteinů v měkkých tkáních za současného snížení imunogenicity a rychlosti vylučování ledvinami. Samotný PEG není schopný rozkladu v živých organismech a po podání je rychle vylučován.

Tradiční proléčiva jsou navržena tak, aby docházelo k rychlému a účinnému enzymatickému odštěpení léčiva z konjugátu nebo právě naopak, aby docházelo

k pozvolnému řízenému uvolňování léčiva z vazby na PEG a mohla tak být udržována terapeutická hladina léčiva v plazmě, aniž by byla tato hladina pro organismus toxická [31].

Obrázek 7 znázorňuje schéma polymerního nosiče, na kterém je přes biologicky rozložitelnou spojku (spacer) navázáno léčivo. Spojka může být tvořena 4 - 5 aminokyselinami (AMK). Jejich sekvence je vybírána podle potřebného účinku – rychlé uvolnění léčiva z vazby na polymerní nosič či jeho pozvolné uvolňování [32]. Spojení polymerního nosiče s léčivem může být také realizováno estery karboxylových kyselin. Hydrolytickým či enzymatickým štěpením esterových vazeb je léčivo uvolněno a stává se tak aktivním. Další funkční jednotkou je zacilovací skupina, která má za úkol navést konjugát k cílové tkáni [33].



Obr. 7: Schéma polymerního konjugátu pro léčivo [33].

2.3.5 Další využití PEGů

Kromě farmaceutického využití mají PEGy uplatnění také jako textilní vlákna, ve vodě rozpustná mazadla, obaly na potraviny, leštidla, látky pro výrobu vlasových a kosmetických přípravků, detergenty, antistatická činidla, katalyzátory, elektrolyty, rozpouštědla či v keramickém průmyslu [24, 25].

2.4 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

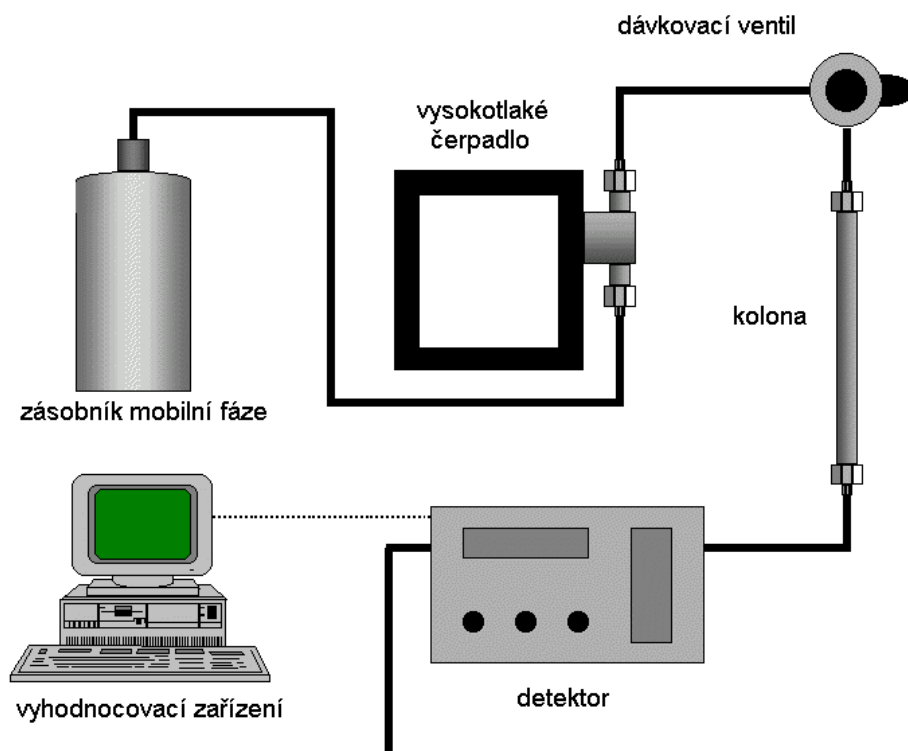
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC - High Performance Liquid Chromatography) je fyzikálně-chemická separační metoda, založená na distribuci složek vzorku mezi dvě různé navzájem nemísitelné fáze. Jedna fáze je mobilní (pohyblivá), druhá stacionární (nepohyblivá) fáze [34, 35].

Separace probíhá v koloně, kde se jako stacionární fáze využívá sorbent v pevném skupenství a jako mobilní fáze je zde kapalina – eluent. Vše pracuje za zvýšeného tlaku. Rozdílné analyty se s rozdílnou afinitou vážou ke stacionární fázi, jinak se zadržují a zpožďují, a tak dochází k rozdělování složek analytu mezi stacionární a mobilní fázi.

Různé sorbenty zadržují složky analytu na základě různých interakcí: hydrofobní interakce (van der Waalsovy síly), interakce dipól-dipól, vodíkové vazby či elektrostatická interakce [34]. Při postupu kolonou se složky zadržují na sorbentu a k detektoru dojdou v různých retenčních časech.

2.4.1 Instrumentace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii

Vysokotlakým čerpadlem je ze zásobníku čerpána mobilní fáze. Ta protéká přes zařízení pro dávkování vzorků do chromatografické kolony a dále k detektoru. Za detektorem je umístěno zaznamenávací a vyhodnocující zařízení (nejčastěji počítač). Kolonu je vhodné temperovat na konstantní teplotu pro lepší reprodukovatelnost. Novější přístroje jsou vybaveny zařízením pro mísení 2 – 4 složek mobilní fáze, čímž vzniká gradient mobilní fáze umožňující eluci s časově programovaným složením. Dále je možno použít doplňkových filtrů či předkolon, zařízení pro odplynování mobilní fáze, ventily pro přepojování několika chromatografických kolon během separace a více detektorů řazených za sebou (Obr. 8) [36].



Obr. 8: Obecné schéma HPLC systému [37].

2.4.1.1 Kolony pro HPLC

Separační kolony v HPLC (Obr. 9) jsou rovné trubice s hladkým vnitřním povrchem, které jsou zhotovené z materiálu, který je odolný vůči vysokému tlaku a chemickému působení mobilních fází. Rozměry kolon závisí na účelu, ke kterému mají být použity, a zároveň na velikosti částic náplně. Vnitřní průměr kolony bývá nejčastěji 2 – 4 mm a délka kolony 50 – 300 mm [36].



Obr. 9: Ukázka kolon používaných v kapalinové chromatografii [38].

Kolony jsou naplněny stacionární fází, nejčastěji oxidem křemičitým o vhodné zrnitosti, který je modifikován navázáním vhodných funkčních skupin. Podle polaritativy stacionární fáze, rozeznáváme normální HPLC (NP-HPLC) a reverzní HPLC (RP-HPLC). U NP-HPLC je použita stacionární fáze polárnější než mobilní fáze a u RP-HPLC je tomu naopak. Stacionární fáze může být i granulovaný iontoměnič. V takovém případě se jedná o iontovýměnnou chromatografii (IEC – Ion Exchange Chromatography). Použitím mikroporézních sorbentů lze získat gelovou permeační chromatografii [39, 40].

2.4.1.2 Stacionární fáze v HPLC

Stacionární fáze je tvořena mikročásticemi silikagelu (3-10 μm), na kterých bývá navázána vlastní stacionární fáze. Ta může být tvořena nepolárními uhlovodíky (C8 – oktan, C18 – oktadekan) nebo polárnějšími uhlovodíky s funkční skupinou (např. -CN a pod) [40].

2.4.1.3 Mobilní fáze v HPLC s obrácenými fázemi

Mobilními fázemi v HPLC s obrácenými fázemi mohou být voda, methanol, acetonitril a jejich směsi v různých vzájemných poměrech, pufrů a další. Zásobníků s různými mobilními fázemi může být více a je možné je spolu automaticky mísit v předem zvoleném poměru [40].

2.4.1.4 Detektory

V HPLC používáme různé detektory lišící se principem, konstrukcí, selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem. Nejčastěji se používá *spektrofotometrický detektor* pro UV-VIS, který pracuje v rozmezí vlnových délek 200 – 700 nm [39]. Dále je možno využít *fluorimetrický detektor*, *refraktometrický detektor* [36] či *elektrochemické detektory*, mezi něž patří *vodivostní detektor* a *amperometrický detektor* [39]. Asi nejvýznamnějším detektorem je dnes *hmotnostní detektor*, který umožňuje přímou identifikaci separovaných látek na základě získaných hmotnostních spekter. Základem je převedení analytu na kladné či záporné ionty (ionizace), které jsou následně převedeny do plynného skupenství a děleny v elektrickém a magnetickém poli podle svých efektivních hmotností m/z . Ionty jsou detekovány elektronovými násobiči, novější přístroje mají fotonásobiče či mnohokanálové detektory.

2.4.2 Spojení vysokoúčinné chromatografie a ultrafialové spektrometrie

Spojení HPLC/UV poskytuje méně informací o struktuře analyzované látky než např. HPLC/MS, přesto je oblíbenou, citlivou a technicky méně náročnou metodou. Realizovat lze pomocí spektrofotometrického detektoru opatřeného monochromátorem pro snímání spekter při zastaveném průtoku mobilní fáze nebo pomocí spektrofotometrického detektoru typu photodiode-array, který poskytuje okamžitá spektra bez nutnosti zastavení toku [36].

2.5 SPEKTROMETRIE V ULTRAFIALOVÉ A VIDITELNÉ OBLASTI

Spektrometrie v UV oblasti měří absorpční spektra molekul v blízké UV (Ultra Violet) části spektra o vlnových délkách 200 – 400 nm. Viditelné záření je zaznamenáváno v oblasti vlnových délek 400 – 800 nm [41, 42].

Při průchodu elektromagnetického záření vzorkem dochází k přechodu valenčních elektronů ze základních energetických hladin do hladin excitovaných za současné změny vibrační a rotační hladiny [42].

Pro měření v UV a VIS spektrometrii jsou vhodné sloučeniny s π elektrony a ne vazebnými elektronovými páry. Proto zde lépe absorbují látky s dvojnými vazbami. Konjugací dvojných vazeb, která je významná např. u aromátů, se absorpce záření posouvá k vyšším vlnovým délkám [41, 42].

Při kvantitativním stanovení se nejčastěji využívá metody kalibrační křivky, méně často metoda standardního přídatku. Nejvhodnější je použít lineární část kalibrační křivky. K výpočtu koncentrace analytu ve vzorku se využívá Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (6)$$

kde A je absorbance, l je tloušťka absorbující vrstvy [cm], c je koncentrace absorbující složky [mol.l^{-1}] a ε je molární absorpční koeficient [$\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$].

Elektronové spektrum se většinou zapisuje jako závislost absorbance nebo $\log \varepsilon$ na vlnové délce λ [41, 43].

V kvalitativní analýze není UV – VIS spektrometrie příliš významnou metodou. K identifikaci látek lze využít knihovny spekter ve spojení s jinými identifikačními metodami (IR, NMR, MS). Metodu lze použít k stanovení čistoty organických sloučenin [43, 44].

Pro měření je nutno používat rozpouštědla, která neabsorbují v UV či VIS oblasti, aby nedocházelo k interferencím. Takovými rozpouštědly jsou například hexan, methanol či ethanol. Kyvety jsou zhotoveny z křemene, jelikož sklo UV záření nepropouští. K měření ve viditelné oblasti se již skleněné kyvety používat mohou.

2.5.1 Instrumentace v UV – VIS spektrometrii

2.5.1.1 Detektory pro UV – VIS spektrometrii

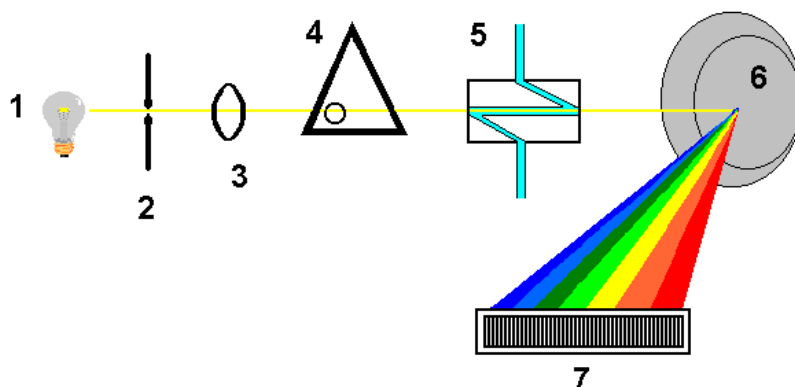
Spektrofotometrické detektory jsou založeny na principu absorpce záření v oblasti vlnových délek od 190 do 800 nm.

Detektory s fixní vlnovou délkou – nejčastěji 253,7 nm. Jako zdroje záření využívají nízkotlakou rtuťovou výbojku. Detektory se konstruují jako dvoupaprskové a měří se rozdíl absorpance mezi měrnou a srovnávací celou.

Detektory s měnitelnou vlnovou délkou – pracují při předem definované vlnové délce, která se mění přidáním příslušného interferenčního filtru [36, 43].

Detektory s programovatelnou vlnovou délkou – detektory obsahují monochromátor a vlnovou délku lze libovolně nastavovat v rozmezí 190 – 700 nm. Lze ji měnit i během analýzy. Některé detektory umožňují měřit při dvou až čtyřech vlnových délkách zároveň.

Detektory diodového pole (photodiode-array, PDA, DAD) – snímají celé spektrum bez přerušení chromatografické separace. Záření zdroje se po průchodu měrnou celou spektrálně rozkládá holografickou mřížkou (Obr. 10). Ve spolupráci s počítačem umožňují tyto detektory pracovat v celém rozsahu vlnových délek UV - VIS oblasti. Lze porovnávat snímaná spektra s knihovnamy spekter a vypočítat číselnou hodnotu píku – identifikace látek [36, 43].



Obr. 10: Schéma detektoru s diodovým polem [43].

1 – zdroj záření, 2 – štěrba, 3 – čočka, 4 – clona, 5 – měrná cela detektoru,
6 – holografická mřížka, 7 - systém fotodiod

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

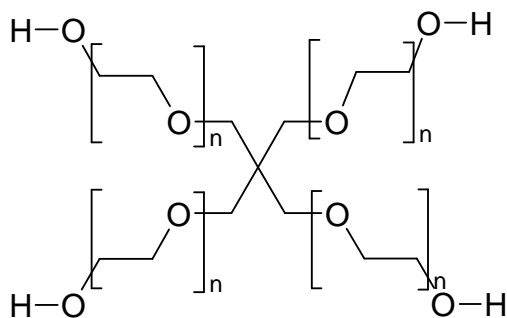
- methanol CHROMASOLV[®] pro gradientovou eluci, Sigma–Aldrich (Steinheim, Německo)
- acetonitril, Multisolvant[®], Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Španělsko)
- fosfátový pufr 0,1M, pH 7,4
- enzym – jaterní prasečí esteráza, Sigma–Aldrich (Steinheim, Německo)

3.2 Použitý standard

- Prednisolon $\geq 99\%$, Sigma–Aldrich (Steinheim, Německo)

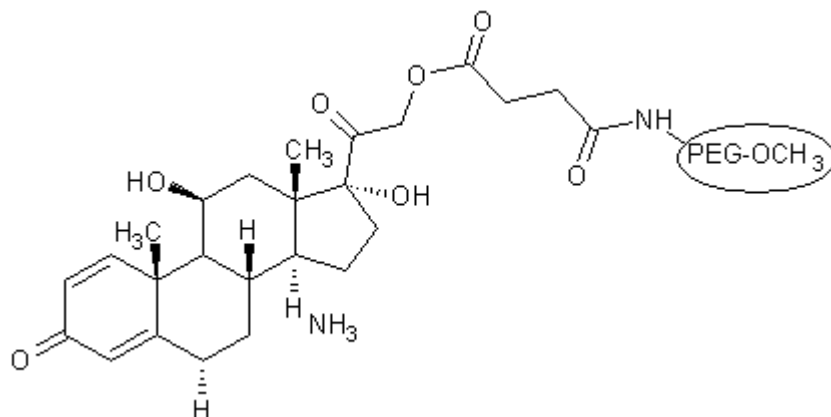
3.3 Použité konjugáty

Jako polymerní nosič byl použit jednoramenný methoxypoly(ethylenglykol) (mPEG) o molekulové hmotnosti $5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a čtyřramenný Star poly(ethylenglykol) (sPEG) o molekulové hmotnosti $20000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Obr. 11).

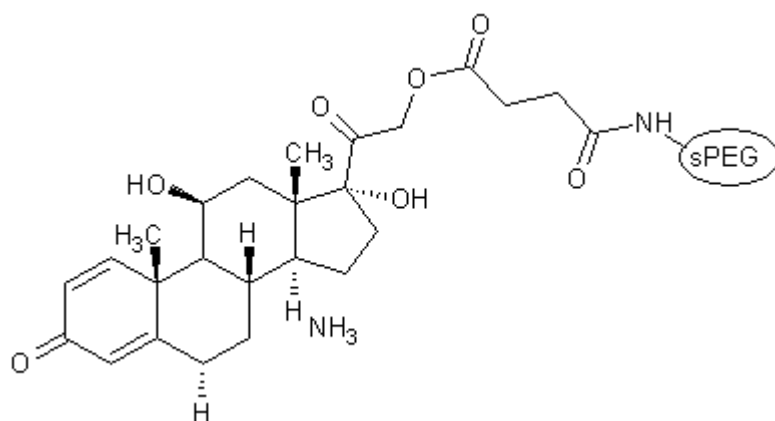


Obr. 11: Star poly(ethylenglykol) (sPEG).

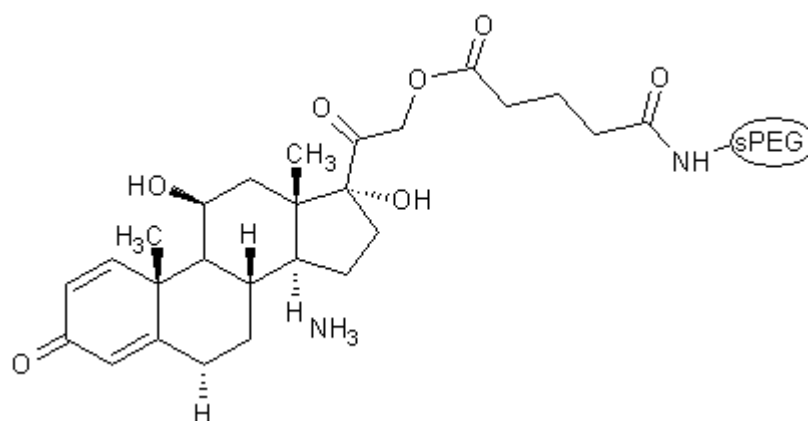
- Konjugát č. 1: sukcinát 5000, PDN-S-mPEG



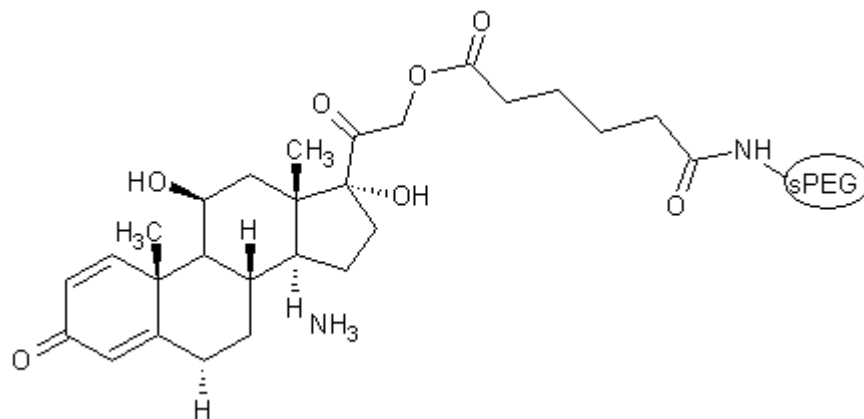
- Konjugát č. 2: sukcinát 20000: PDN₄-S-sPEG



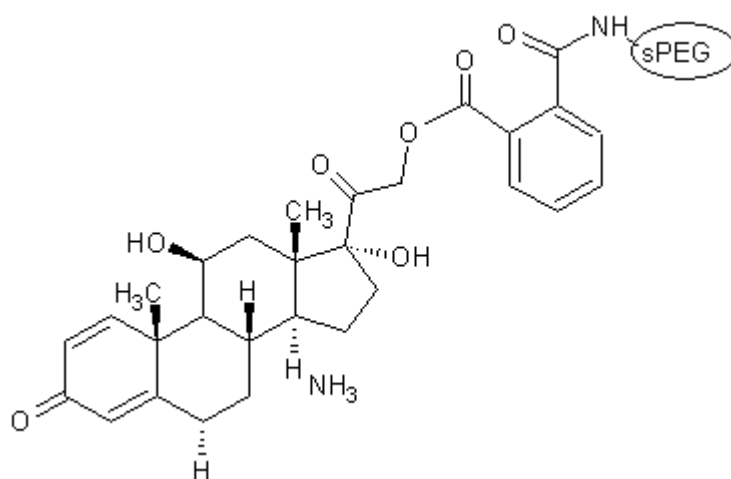
- Konjugát č. 3: glutarát 20000; PDN₄-G-sPEG



- Konjugát č. 4: adipát 20000; PDN₄-A-sPEG



- Konjugát č. 5: ftalát 20000: PDN₄-F-sPEG



3.4 Použité přístroje

3.4.1 HPLC/UV

Uspořádání pro HPLC (Obr. 12) je od společnosti Shimadzu (Tokio, Japonsko) a skládá se z těchto částí:

- dvě vysokotlaké pumpy LC – 10AD_{VP}
- odplyňovač mobilní fáze DGU – 14A
- řídicí jednotka SCL – 10A_{VP}
- spektrofotometrický UV detektor s diodovým polem SPD – M10A_{VP}



Obr. 12: Sestava HPLC [46].

Vlastní separace probíhala na koloně LiChroCART[®] (Obr. 13) 125 x 4 mm s náplní LiChrospher[®] 100 RP – 18e 5 μ m, Merck (Darmstadt, Německo) chráněné předkolonkou (4 x 3 mm I.D.) s náplní C18, Phenomenex (Torrance, CA, USA).

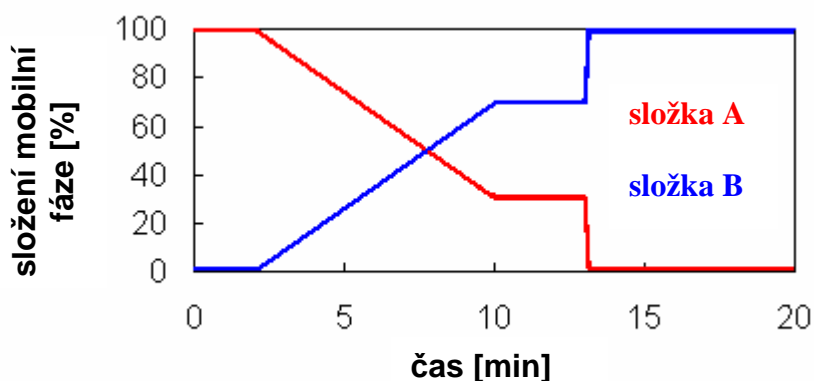


Obr. 13: Ukázka kolony a předkolonek [47, 48].

Sestava byla připojena k datové stanici vybavené programem LabSolutionVer3, Shimadzu (Tokio, Japonsko). Tento program umožňuje záznam hmotnostních a UV spekter, které lze následně vyhodnocovat integrací, je také možné chromatogramy vzájemně porovnávat a mnoho dalších operací.

3.4.1.1 Podmínky pro HPLC/UV [49]

- kolona – LiChroCART[®], RP18e
- nástřik – 20 μ l
- průtok mobilní fáze – 1 ml.min⁻¹
- mobilní fáze – 45% (A) a 100% (B) vodný roztok methanolu
 - gradientová eluce (Ob. 14)



Obr. 14: Gradientové složení mobilní fáze

- teplota termostatu – 25 °C
- délka analýzy – 20 minut

Jednotlivé složky mobilní fáze byly před použitím filtrovány hydrofilním propylenovým membránovým filtrem Pall Corporation (Ann Arbor, Michigan, USA) o velikosti pórů 0,45 μ m.

3.4.2 Horkovzdušný sterilizátor

K zajištění stálé teploty 37 °C byl použit horkovzdušný sterilizátor STERICELL[®] (Obr. 14) od společnosti BMT – Brněnská medicínská technika a.s., (Brno, ČR). Přístroj slouží k horkovzdušné sterilizaci materiálů při stanovených parametrech teploty a času. V komoře přístroje je zajištěno stálé proudění vzduchu pomocí vestavěného ventilátoru, který eliminuje vznik oblasti „studeného vzduchu“. Teplotu lze nastavit v rozmezí od 10 °C nad okolní teplotou do 250 °C [50].



Obr. 15: *Horkovzdušný sterilizátor STERICELL® [50].*

3.5 Kalibrační řada

Kalibrační řada byla připravena rozpuštěním standardu prednisolonu v methanolu. Nejprve byl připraven zásobní roztok prednisolonu o koncentraci 1 mg.ml^{-1} , jehož ředěním byly připraveny koncentrace prednisolonu 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a $100 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$. Jednotlivé roztoky byly proměřeny metodou HPLC a detekovány UV detektorem v rozmezí vlnových délek 230 – 290 nm. Vyhodnocování a integrace píků byla prováděna programem LabSolutionVer3 při vlnové délce 245 nm, jelikož prednisolon vykazuje při této vlnové délce maximum absorpance. Byla sestavena závislost odezvy detektoru (plocha píků) na koncentraci prednisolonu.

3.6 Enzymová kinetika

Konjugáty poly(ethylenglykolu) (PEGu) s navázaným prednisolonem byly enzymaticky naštěpeny enzymem jaterní prasečí esteráza a byla zaznamenána časová závislost koncentrace uvolněného prednisolonu. Proměřována byla kompletní kinetická křivka pro uvolňování prednisolonu a byly vypočteny poločasy reakcí a rychlostní konstanty. Pro určení parametrů enzymové kinetiky byly měřeny závislosti množství uvolněného prednisolonu při různých koncentracích konjugátu a při stálé koncentraci enzymu. Byly získány počáteční rychlosti reakcí, ze kterých byla sestrojena saturační křivka a její linearizované tvary.

3.6.1 Měření kinetické křivky

Rozpuštěním 1 mg enzymu v 10 ml fosfátového pufru o pH 7,4 byl připraven roztok enzymu. Dále byl připraven roztok konjugátu rozpuštěním 15 mg konjugátu v 0,5 ml methanolu. Z roztoku enzymu byl odebrán 1 ml do derivatizační vialky a bylo přidáno 20 μ l roztoku konjugátu. Vzorek reakční směsi byl proměřován po 25 minutách a byla zaznamenávána závislost koncentrace uvolněného prednisolonu na čase, ze které byly vyhodnoceny poločasy $\tau_{1/2}$ reakce a rychlostní konstanty k podle kinetické rovnice pseudoprvního řádu:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (7)$$

3.6.2 Měření parametrů kinetické rovnice

Roztok enzymu byl získán rozpuštěním 1 mg enzymu v 10 ml fosfátového pufru o pH 7,4. Roztok enzymu byl dále 5x zředěn fosfátovým pufrem o pH 7,4. Dále byl připraven zásobní roztok konjugátu rozpuštěním 100 mg konjugátu v 0,5 ml methanolu. K získání daných koncentrací byly do derivatizačních vialek odměřeny různé objemy tohoto enzymu a postupně byly přidávány různé objemy roztoku konjugátu podle tabulky I.

Tabulka I: Příprava jednotlivých roztoků konjugátů PEG-prednisolon o různých koncentracích pro vzorek č. 5.

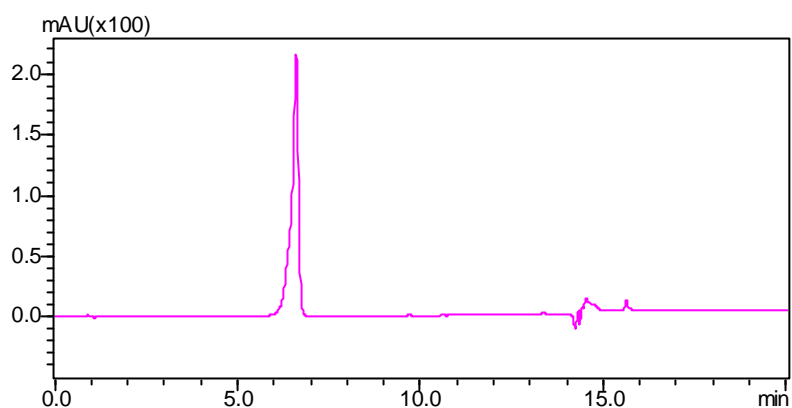
Objem enzymu [ml]	Objem konjugátu [μl]	Koncentrace konjugátu [mg.ml ⁻¹]
1,0	10	1,98
0,4	10	4,88
0,5	20	7,69
0,5	40	14,81
0,5	60	21,43
0,4	70	29,79
0,4	100	40,00

Byla zaznamenávána závislost množství uvolněného prednisolonu na čase a naměřené hodnoty byly vyhodnoceny metodou počátečních rychlostí s využitím nelineární regrese a linearizace rovnice Michaelise a Mentenové, viz kapitola 2.2.3.

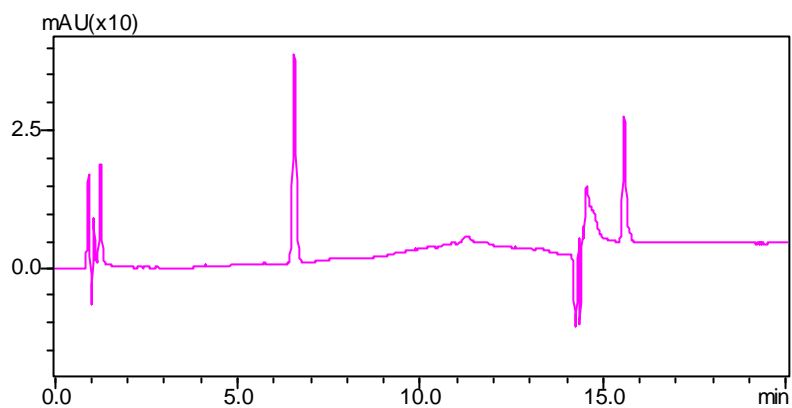
4 Výsledky a diskuse

4.1 Výběr experimentálních podmínek

Experimentální podmínky byly zvoleny na základě předchozí práce zabývající se optimalizací metody HPLC/UV pro methylprednisolon a jsou popsány v předcházející kapitole. Po separaci látek na chromatografické koloně byl získán záznam UV spektra prednisolonu. Na chromatogramu standardního roztoku prednisolonu (Obr. 16) lze vidět jeden pík v čase 6,54 min. Na chromatogramu konjugátu (Obr. 17) jsou viditelné i další píky příslušející polymernímu nosiči.



Obr. 16: Záznam chromatografické separace standardního roztoku prednisolonu.



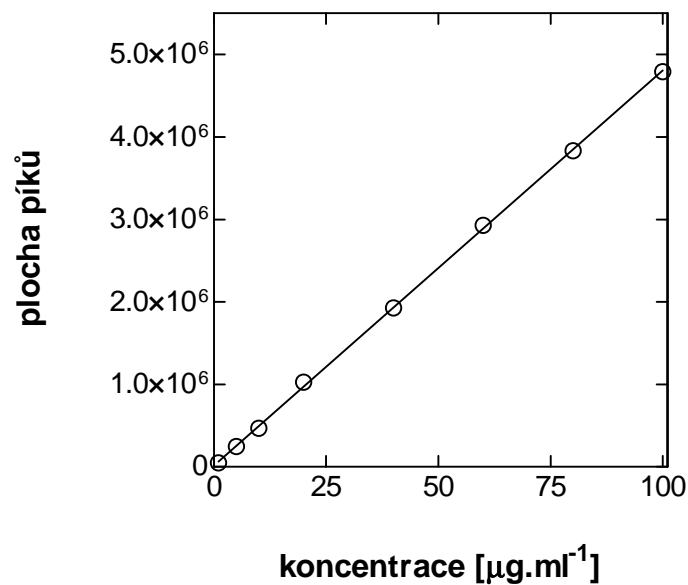
Obr. 17: Záznam chromatografické separace konjugátu č. 4 - PDN₄-A-sPEG.

4.2 Kalibrační řada

Pro sestavení kalibrační závislosti (Obr. 18) byly připraveny standardní roztoky prednisolonu o koncentracích 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Roztoky byly třikrát proměřeny metodou HPLC/UV a byla sestrojena závislost plochy píků na koncentraci prednisolonu odpovídající lineárnímu regresnímu modelu:

$$y = 47902 \cdot x + 16406$$

$$R^2 = 0,9997$$



Obr. 18: Kalibrační závislost plochy píků na koncentraci prednisolonu

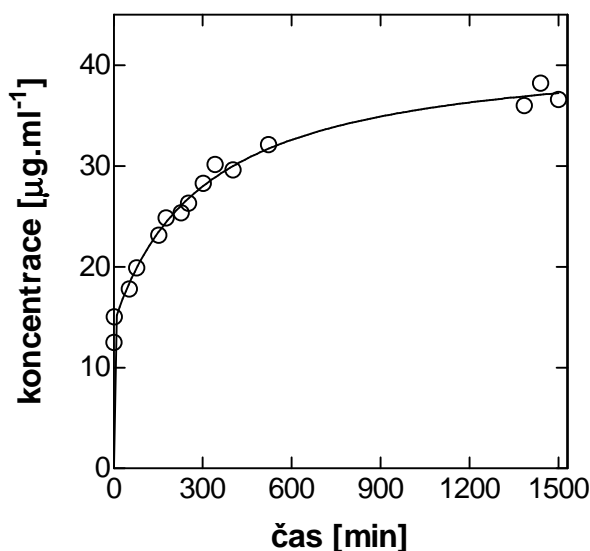
4.3 Měření kinetické křivky

Byly proměřeny kinetické křivky enzymatického štěpení 5 různých konjugátů prednisolonu s poly(ethylenglykolem). Rychlost uvolňování prednisolonu se za experimentálních podmínek řídí kinetickou rovnicí pseudoprvního řádu.

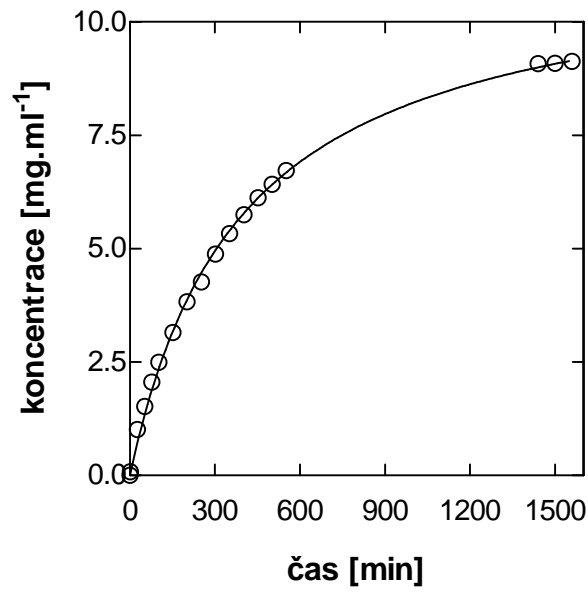
$$[P] = [P]_{\infty} - \frac{\exp(-k \cdot t)}{[P]_0} \quad (8)$$

[P] koncentrace prednisolonu v čase
 [P]₀.... počáteční koncentrace prednisolonu
 [P]_∞.... maximální koncentrace prednisolonu
 k rychlostní konstanta
 t čas

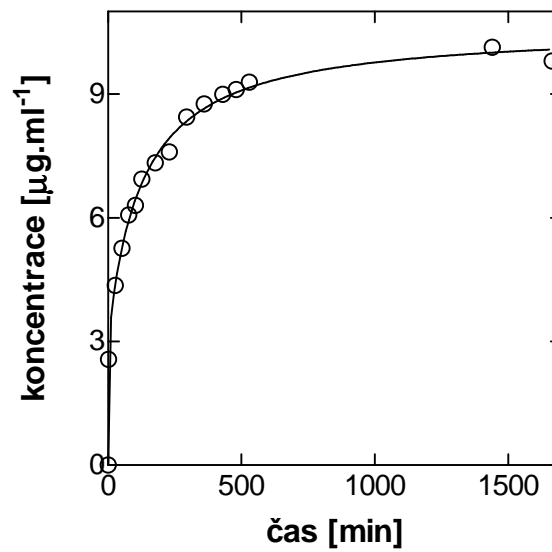
Prvním bodem křivky je vzorek s teoreticky nulovým obsahem volného prednisolonu připravený rozpuštěním známého množství vzorku konjugátu ve fosfátovém pufru o pH 7,4. Reálně nulové koncentrace volného prednisolonu nebylo v některých vzorcích dosaženo, jelikož se při organické syntéze konjugátu nenavázal veškerý prednisolon na PEG, a tudíž zůstalo ve vzorku i určité množství volného prednisolonu. Dalším bodem křivky je množství volného prednisolonu ve 2 minutách po smíchání. Následovala měření po 25 minutách, posléze s delšími intervaly mezi měřeními. Pro všechny konjugáty byly sestrojeny křivky závislosti koncentrace uvolněného prednisolonu na čase (Obr. 19 – 23), ze kterých byly vypočteny rychlostní konstanty a následně vyhodnoceny poločasy uvolnění prednisolonu z polymerního nosiče. Měření bylo provedeno pro všechny vzorky konjugátů a získané hodnoty jednotlivých poločasů a rychlostních konstant byly porovnány v tabulce II.



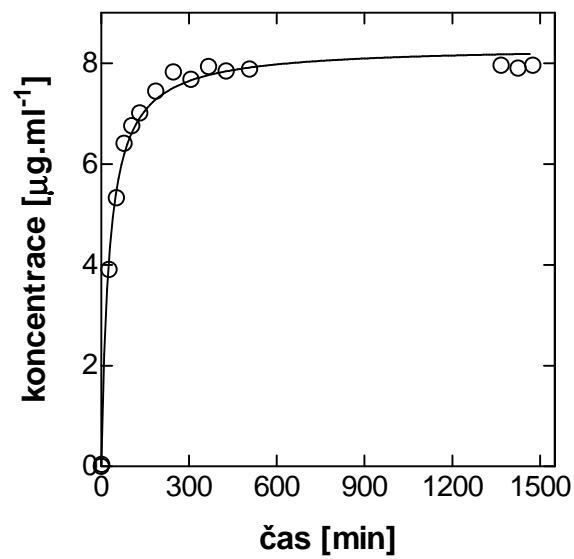
Obr. 19: Závislost koncentrace uvolněného prednisolonu na čase pro vzorek č. 1.



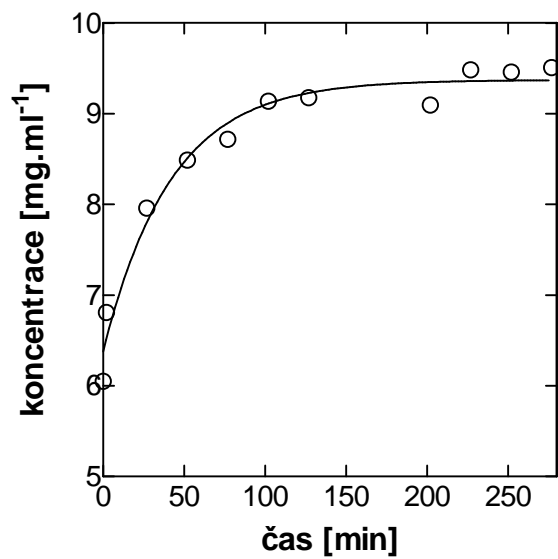
Obr. 20: Závislost koncentrace uvolněného prednisolonu na čase pro vzorek č. 2.



Obr. 21: Závislost koncentrace uvolněného prednisolonu na čase pro vzorek č. 3.



Obr. 22: Závislost koncentrace uvolněného prednisolonu na čase pro vzorek č. 4.



Obr. 23: Závislost koncentrace uvolněného prednisolonu na čase pro vzorek č. 5.

Tabulka II: Porovnání parametrů enzymové kinetiky pro jednotlivé konjugáty.

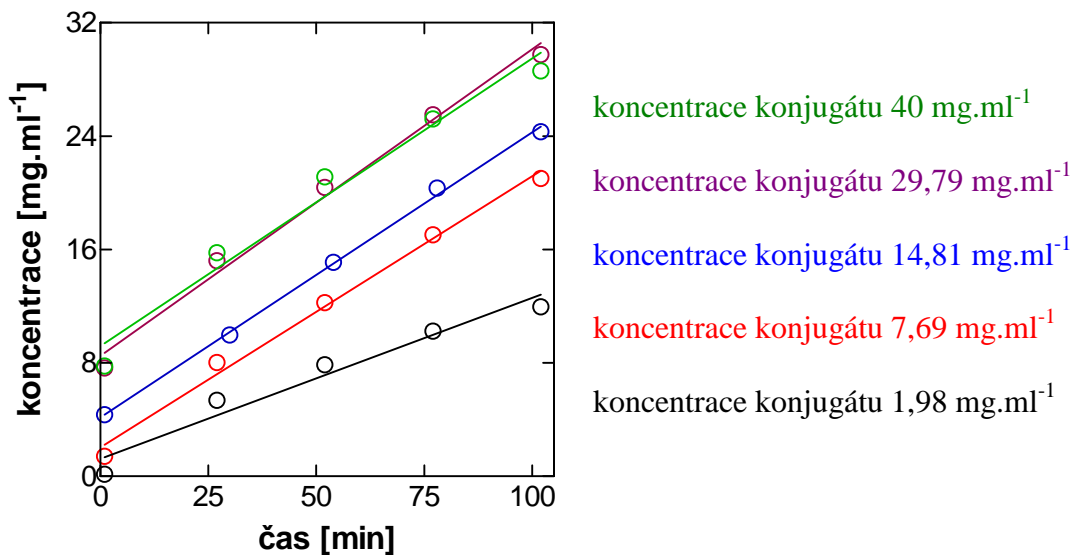
Vzorek	Konjugát	Rychlostní konstanta [min^{-1}]	Poločas $\tau_{1/2}$ [min]
1	PDN-S-mPEG	$3,35 \cdot 10^{-3} \pm 0,22 \cdot 10^{-3}$	207 ± 6
2	PDN ₄ -S-sPEG	$2,31 \cdot 10^{-3} \pm 0,06 \cdot 10^{-3}$	300 ± 3
3	PDN ₄ -G-sPEG	$5,90 \cdot 10^{-3} \pm 0,54 \cdot 10^{-3}$	117 ± 9
4	PDN ₄ -A-sPEG	$2,10 \cdot 10^{-2} \pm 0,09 \cdot 10^{-2}$	33 ± 4
5	PDN ₄ -F-sPEG	$3,08 \cdot 10^{-2} \pm 0,28 \cdot 10^{-2}$	23 ± 8

Z porovnání rychlosti reakce pro konjugáty se stejnou spojkou (derivát kyseliny jantarové) PDN-S-mPEG a PDN₄-S-sPEG vyplývá, že větvení řetězce PEGu vede ke zpomalení reakce. V konjugátu PDN-S-mPEG je nosičem lineární monofunkční poly(ethylenglykol) s koncovou methoxyskupinou o molekulové hmotnosti $5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. V konjugátu PDN₄-S-sPEG je pak nosičem čtyřramenný star-poly(ethylenglykol) o molekulové hmotnosti $20000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Zpomalení reakce vlivem větší sterické náročnosti větveného PEGu není natolik výrazné zřejmě právě proto, že molární poměr PDN vůči PEGu je u obou konjugátů stejný.

Srovnání rychlosti reakce pro trojici konjugátů PDN₄-A-sPEG, PDN₄-G-sPEG a PDN₄-S-sPEG vede k závěru, že zkracování uhlíkového řetězce tvořícího spojku mezi prednisolonem a PEGem vede k prodlužování poločasu reakce, a to při zkrácení o 2 uhlíkové atomy téměř 10tinásobně (derivát kys. adipové - PDN₄-A-sPEG – 33 minut vs. derivát kys. jantarové - PDN₄-S-sPEG – 300 minut). Poločas reakce pro derivát kys. glutarové PDN₄-G-sPEG leží podle očekávání mezi těmito dvěma hodnotami. Strukturně mimo tuto sérii leží konjugát PDN₄-F-sPEG obsahující spojku tvořenou derivátem kyseliny ftalové. Ten podléhá reakci s enzymem esterázou nejrychleji ze všech měřených vzorků, což lze připsat nejen výhodnému sterickému uspořádání, ale především elektronickým vlivům aromatického skeletu usnadňujícím reakci.

4.4 Měření parametrů kinetické rovnice

Pro vzorek č. 4 byly získány parametry enzymové kinetiky K_M a v_{max} dle rovnice Michaelise a Mentenové. K měření a vyhodnocení získaných dat byla použita metoda počátečních rychlostí. Pro různé koncentrace konjugátu v roztoku s konstantní koncentrací enzymu byly proměřeny závislosti koncentrace uvolněného prednisolonu na čase v počátku reakce, kdy je nárůst koncentrace lineární (Obr. 24). Enzym musel být zředěn na takovou koncentraci, aby došlo k jeho nasycení substrátem. S dalším zvyšováním koncentrace substrátu již počáteční rychlost reakce zůstává konstantní, což signalizuje dosažení mezní rychlosti v_{max} .

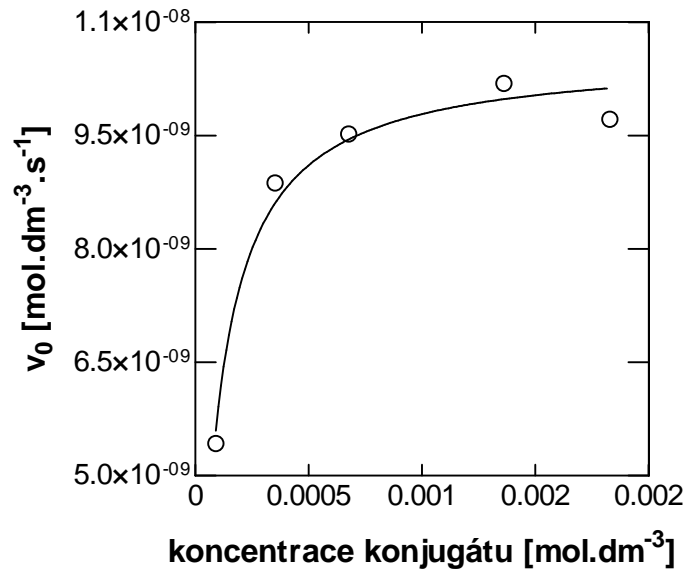


Obr. 24: Časová závislost koncentrace uvolněného prednisolonu pro různé koncentrace konjugátu.

Z naměřených dat byla sestrojena saturační křivka enzymu a byly vypočteny kinetické parametry K_M a v_{max} .

4.4.1 Vyhodnocení experimentálních dat nelineární regresí

Pro různé koncentrace konjugátu č. 4 byly proměřeny hodnoty koncentrace uvolněného prednisolonu měnící se v závislosti na čase. Vynesením počátečních rychlostí reakce v závislosti na koncentraci konjugátu byla sestrojena saturační křivka (Obr. 25).



Obr. 25: Závislost počátečních rychlostí reakce na koncentraci konjugátu č. 4.
Saturační křivka.

Naměřená data byla zpracována metodou počátečních rychlostí a nelineární regresí byly získány hodnoty parametrů rovnice Michealise a Mentenové K_M a v_{\max} .

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot c_S}{K_M + c_S} \quad (1)$$

$$v_0 = \frac{1,0572 \cdot 10^{-8} \cdot c_S}{8,0515 \cdot 10^{-5} + c_S}$$

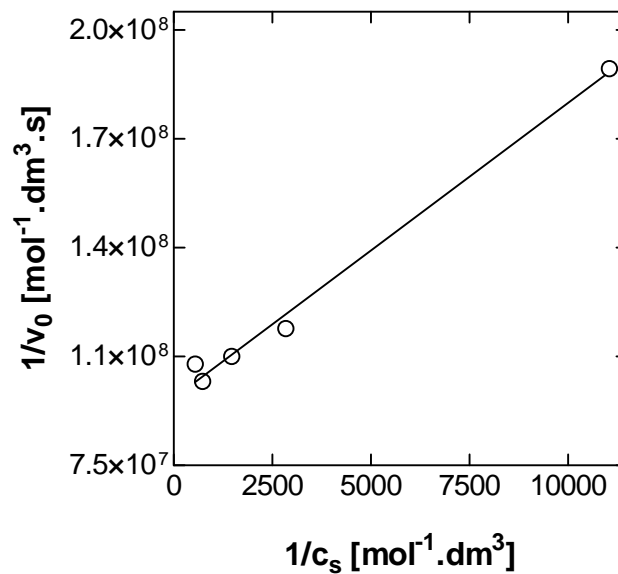
$$v_{\max} = \underline{1,0572 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}}$$

$$K_M = \underline{8,0515 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}}$$

4.4.2 Vyhodnocení experimentálních dat metodou linearizace rovnice Michaelise a Mentenové.

4.4.2.1 Vyhodnocení dat podle Lineweavera a Burka.

Do grafu (Obr. 26) byla vynesena závislost $1/v_0$ na $1/c_s$, čímž byla získána přímka, jejíž směrnice je K_M/v_{\max} , úsek na svislé ose je roven $1/v_{\max}$ a úsek na vodorovné ose hodnotě $-1/K_M$.



Obr. 26: Linearizace podle Lineweavera a Burka

Michaelisova konstanta K_M a maximální rychlost reakce v_{\max} byly získány lineární regresí experimentálních dat:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{c_s} \quad (2)$$

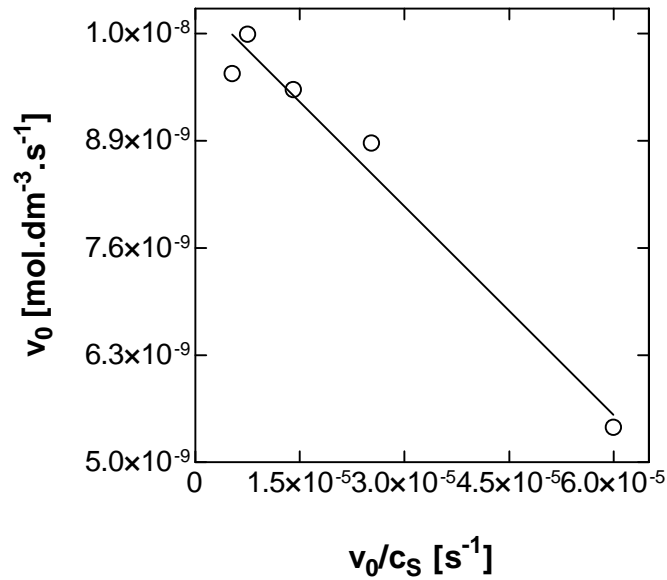
$$\frac{1}{c_s} = 9,3540 \cdot 10^7 + 8,1355 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{v_0}$$

$$v_{\max} = \frac{1}{9,3540 \cdot 10^7} = \underline{1,0691 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}}$$

$$K_M = 8,1355 \cdot 10^3 \cdot v_{\max} = 8,1355 \cdot 10^3 \cdot 1,06906 \cdot 10^{-8} = \underline{8,69735 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}}$$

4.4.2.2 Vyhodnocení dat podle Eadiea.

Z lineární závislosti v_0 na v_0/c_s (Obr. 27) lze získat K_M jako směrnicí a v_{\max} jako úsek na svislé ose (úsek na vodorovné ose je v_{\max}/K_M):



Obr. 27: Linearizace dat podle Eadiea.

Michaelisova konstanta K_M a maximální rychlost reakce v_{\max} byly získány lineární regresí experimentálních dat:

$$v_0 = v_{\max} - K_M \cdot \frac{v_0}{c_s} \quad (3)$$

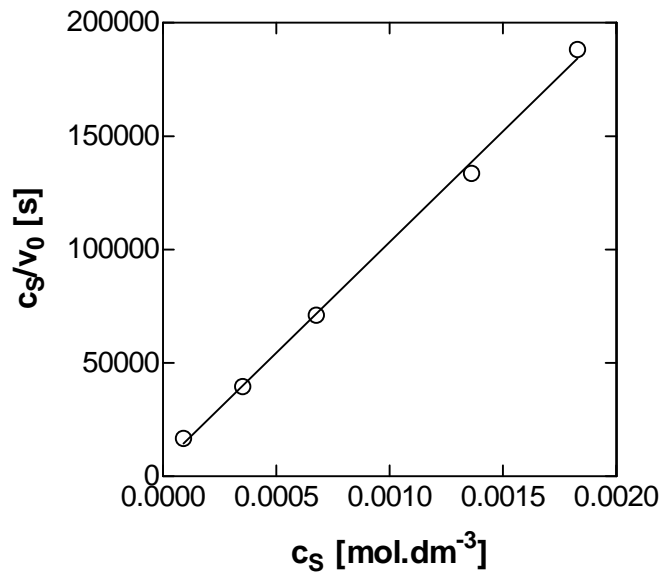
$$v_0 = 1,06362 \cdot 10^{-8} - 8,44223 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{v_0}{c_s}$$

$$v_{\max} = \underline{1,06362 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}}$$

$$K_M = \underline{8,44223 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}}$$

4.4.2.3 Vyhodnocení dat podle Hanese.

Poměr c_s/v_0 je lineární funkcí koncentrace c_s . Úsek na svislé ose je roven poměru K_M/v_{\max} , úsek na vodorovné ose hodnotě $-K_M$ a směrnice je $1/v_{\max}$ (Obr. 28).



Obr. 28: Linearizace dat podle Hanese.

Michaelisova konstanta K_M a maximální rychlost reakce v_{\max} byly získány lineární regresí experimentálních dat:

$$\frac{c_s}{v_0} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}} \cdot c_s \quad (4)$$

$$\frac{c_s}{v_0} = 5,6957 \cdot 10^3 + 9,7644 \cdot 10^7 \cdot c_s$$

$$v_{\max} = \frac{1}{9,7644 \cdot 10^7} = 1,02413 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$K_M = 5,6957 \cdot 10^3 \cdot v_{\max} = 5,6957 \cdot 10^3 \cdot 1,06906 \cdot 10^{-8} = \underline{5,83313 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}}$$

Tabulka III: Porovnání parametrů kinetické rovnice vyhodnocené různými metodami.

Metoda	K_M [mol·dm ⁻³]	v_{\max} [mol·dm ⁻³ ·s ⁻¹]
Nelineární regrese	$8,0500 \cdot 10^{-5}$	$1,0570 \cdot 10^{-8}$
Lineweaver a Burke	$8,6974 \cdot 10^{-5}$	$1,0691 \cdot 10^{-8}$
Eadiea	$8,4422 \cdot 10^{-5}$	$1,0636 \cdot 10^{-8}$
Hanes	$5,8331 \cdot 10^{-5}$	$1,0241 \cdot 10^{-8}$

Michaelisova konstanta K_M je rovna takové koncentraci substrátu, při níž je dosaženo polovičního nasycení enzymu a tím i poloviny limitní rychlosti reakce. Obvykle se hodnoty K_M pohybují v širokém rozmezí $0,1 - 10^{-6}$ mol·dm⁻³ a umožňují odhadnout rychlost štěpení substrátu enzymem [20]. Nízké hodnoty K_M v tabulce III ukazují na silnou vazbu mezi enzymem a substrátem.

Limitní rychlost reakce v_{\max} poukazuje na rychlost, které dosáhne reakce tehdy, je-li enzym nasycen substrátem. V tomto případě je veškerý substrát vázán na enzym a je tedy úplně přítomen v komplexu enzym-substrát.

5 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá vyhodnocováním kinetických parametrů, které popisují aktivitu enzymu jaterní prasečí esterázy ve vztahu ke konjugátům poly(ethylenglykolu) s prednisolonem navázaným přes různé spojky. Byly proměřeny závislosti množství uvolněného prednisolonu z konjugátu poly(ethylenglykolu) s různými spojkami. Získaná data kompletní kinetické křivky byla použita k výpočtu rychlostní konstanty a následně k vyhodnocení poločasu uvolnění prednisolonu z polymerního nosiče. Dále byla podle metody počátečních rychlostí naměřena data, ze kterých byla sestrojena saturační křivka a byly získány parametry enzymové kinetiky K_M a v_{max} dle rovnice Michaelise a Mentenové.

Prednisolon sám nemá požadované vlastnosti, aby se mohl používat jako léčivo samostatně. Pro zvýšení rozpustnosti ve vodě a lepší distribuci léčiva ve vodném prostředí organismu může být prednisolon přes různé spojky vázán na polymerní nosiče, např. poly(ethylenglykol). Vyhodnocením získaných dat bylo zjištěno, že u konjugátů se stejnou spojkou ale rozdílnou strukturou PEGu vede větvení řetězce PEGu ke zpomalení reakce. Poločasy reakcí mezi jednoramenným PEGem s molekulovou hmotností $5000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a čtyřramenným PEGem s molekulovou hmotností $20000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ však nejsou příliš odlišné, což může být přisuzováno tomu, že molární poměr prednisolonu vůči PEGu je u obou konjugátů stejný. Dále bylo prokázáno, že zkracování uhlíkového řetězce tvořícího spojku mezi prednisolonem a PEGem vede k prodlužování poločasu reakce. Zkrácení spojky o 2 uhlíkové atomy prodlužuje poločas reakce téměř 10tinásobně. Nejrychleji probíhalo štěpení u konjugátu PDN₄-F-sPEG obsahující spojku tvořenou derivátem kyseliny ftalové, což je důsledkem výhodného sterického uspořádání a především elektronických vlivů aromatického skeletu usnadňujícím reakci.

Bylo tedy prokázáno, že volbou vhodné struktury polymerního nosiče a délkou a charakterem spojky lze volit potřebné farmakokinetické vlastnosti proléčiv. Lze tak směřovat proléčivo na určité místo v organismu a prodlužovat dobu působení léčivé látky, čímž lze dosáhnout optimálního účinku prednisolonu na organismus.

Seznam použité literatury

- [1] Kodíček, M., *Biochemické pojmy*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Vydavatelství VŠCHT, Praha 2007.
- [2] Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J., *Farmakochemie*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Vydavatelství VŠCHT, Praha 2007.
- [3] Melichar, B. a kol., *Chemická léčiva*, Avicenum, Zdravotnické nakladatelství, Praha 1987.
- [4] Hanč, O., Pádr, Z., *Hormony*, 2. vydání, Academia, Praha 1982.
- [5] http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/steroid_horm.ppt, staženo 16.2.2009
- [6] Murray, R. K., *Harperova biochemie*, H&H, Jihočany 2001.
- [7] <http://ibiochemie.upol.cz/WebGraphics/biochemie/download/Modul-04.ppt> staženo 17.2.2009, staženo 16.2.2009.
- [8] <http://www.sportvital.cz/cz/k1,111,159-anabolika/c797-biosynteticka-draha-anabolickyh-steroidu/>, staženo 17.2.2009.
- [9] http://www.petrwaldauf.cz/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=72&Itemid=13&lang=cs, staženo 17.2.2009.
- [10] http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/metabolismus_steroidu.ppt, staženo 17.2.2009.
- [11] http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/steroid_horm.ppt, staženo 17.2.2009.
- [12] <http://www.lekopis.cz/Default.htm>, staženo 26.2.2009.
- [13] <http://www.schmerznetz.at/view.php?datID=1220>, staženo 26.2.2009.
- [14] <http://www.medicinenet.com/prednisolone/article.htm>, staženo 26.2.2009.
- [15] http://195.250.138.169/dmev/documents/05_Hampl.pdf, staženo 26.2.2009.
- [16] <http://biologie.php5.cz/enzymy.php>, staženo 10.3.2009.
- [17] Voet, D., Voetová, J. G., *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha 1995.
- [18] Racek, J., *Klinická biochemie*, Galén, Praha 1999.
- [19] Štern, P. a kol., *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*, Karolinum, Praha 2005.

- [20] Bartovská, L., *Chemická kinetika*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze VŠCHT, Praha 2008.
- [21] <http://www.biomed.cas.cz/mbu/biotrans.htm/výuka>, staženo 10.3.2009.
- [22] <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/1/1/1.html>, staženo 10.3.2009.
- [23] Brüsehauer, E., Böttcher, D., Musidłowska-Persson, A., Albrecht, D., Hecker, M., Doderer, K., Bornscheuer, U. T., *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76, 853–859.
- [24] Richardson, M. L., Gangolli, S., *The dictionary of Substances and their effects*, 1994, 6, 714-725.
- [25] Budavari, S. et al., *The Merck Index*, 1996, 1304-1305.
- [26] Winek, C. L. et al., *Clin. Toxicol.*, 1978, 13, 297.
- [27] Tyl R.W. et al., *Fundamental and Applied Toxicology*, 1995, 27, 49.
- [28] Úlehlová E., Šíkola M., Hokeová Z., Chundela B., *Soudní lék*, 1974, 19, 34.
- [29] Abuchowski, A.; van Es, T., Palczuk, N. C., Davis, F. F., *J. Biol. Chem.*, 1977, 252, 3578-3581.
- [30] Greenwald, R. B., *J. Control Release*, 2001, 74, 159-171.
- [31] Stella V. J, Charman W. N, Naringrekar V. H., *Drugs*, 1985, 29, 455-73.
- [32] Řehula, M., *Základy biofarmacie*, Univerzita Karlova, Praha 1993.
- [33] Ringsdorf, H. J., *Polym. Sci., Polym. Symp.*, 1975, 51, 135-153.
- [34] <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>, staženo 3.3.2009.
- [35] <http://hplc.sweb.cz/>, staženo 3.3.2009.
- [36] Churáček, J., *Analytická separace látek*, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1990.
- [37] <http://www.lcresources.com/resources/getstart/generic%20HPLC.gif>, staženo 5.3.2009.
- [38] http://www.separationsnow.com/FCKeditor/UserFiles/Image/sepNOW_advertorials/0809_hplc_agilent/poro120columns.jpg, staženo 4.3.2009.
- [39] Opekar, F., *Základní analytická chemie*, Karolinum, Praha 2002.
- [40] http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie.doc, staženo 4.3.2009.

- [41] Macháček, V., Panchartek, J., Večeřa, M., *Organická chemie*, Univerzita Pardubice, Pardubice 2001.
- [42] <http://aix-lin.upol.cz/~milde/IM-UV-Vis.pdf>, staženo 4.3.2009.
- [43] http://www.hplc.cz/Teorie/UV_VIS_detector.html, staženo 4.3.2009.
- [44] http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab.htm, staženo 3.3.2009.
- [45] <http://www.prolekare.cz/pdf?id=2869>, staženo 6.4.09.
- [46] http://www.meadowshplc.com/hplc_instruments_shimadzu_hplc_system.htm staženo 5.4.2009.
- [47] http://www.separationsnow.com/FCKeditor/UserFiles/Image/sepNOW_advertorials/0809_hplc_agilent/poro120columns.jpg, staženo 5.4.2009.
- [48] http://www.ecomsro.cz/gallery.aspx?image=/images/products/5/541/Security_Guard_Cartridges.jpg, staženo 5.4.2009.
- [49] Dvořák, B., *Diplomová práce*, Univerzita Pardubice, Pardubice 2008.
- [50] www.bmt.cz, staženo 5.4.2009