

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Disertační práce:

**Analýza léčiv a potenciálních léčiv
v biologickém materiálu s využitím
kapalinové chromatografie**

(Soubor publikovaných prací doplněných komentářem)

Kandidát: Mgr. Petra Reimerová

Školitel: doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

.....
Mgr. Petra Reimerová

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat své školitelce, doc. PharmDr. Petře Štěrbové, Ph.D., za její ochotu a trpělivost po celou dobu mého doktorského studia a všechny cenné rady a připomínky při experimentální práci i psaní publikovaných článků a disertační práce.

Dále bych chtěla poděkovat současným i bývalým kolegům z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy, především Mgr. Haně Bavlovič Piskáčkové, doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D., PharmDr. Vítu Šestákovi, Ph.D. a PharmDr. Jánů Stariatovi, Ph.D. za přátelské pracovní prostředí a pomoc a rady při každodenní experimentální práci.

Velký dík patří také spoluautorům předložených publikací, především z týmů prof. Šimůnka, doc. Roha a doc. Štěrby, a PharmDr. Janu Burešovi, Ph.D. za skvělou spolupráci při výzkumu, bez níž by tato práce nemohla vzniknout.

Tato práce byla finančně podpořena z grantů Univerzity Karlovy (projekt SVV 260 401) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekt GAUK 344 615).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Mgr. Petra Reimerová

Školitel: doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.

Název: Analýza léčiv a potenciálních léčiv v biologickém materiálu s využitím kapalinové chromatografie

Bioanalytické metody hrají významnou roli již při vývoji nových léčiv. Stanovení koncentrace sledovaného léčiva v biologických matricích může totiž pomoci odhalit jeho mechanismus účinku, určit hodnoty základních farmakokinetických parametrů nebo studovat osud potenciálního léčiva během *in vitro* experimentů. Vzhledem ke komplexnosti biologických vzorků a nízkým koncentracím studovaných látek je velmi důležitá úprava vzorku před samotnou analýzou. V moderní bioanalýze mají významné zastoupení miniaturizované formy úpravy vzorku odvozené od klasických extrakčních technik, které umožní snížit spotřebu biologického vzorku i laboratorního materiálu na minimum a usnadňují případnou automatizaci procesu.

Jednou z výrazných oblastí ve vývoji nových léčiv je v současnosti léčba onkologických onemocnění. Vývoj vysoce účinných protinádorových léčiv a prodloužení délky přežití pacientů s sebou bohužel přinesly riziko vzniku pozdních komplikací spojených s protinádorovou léčbou, včetně závažných nežádoucích účinků jako je například poškození srdce po podání antracyklinů vedoucí v některých případech až k srdečnímu selhání.

Experimentální část této práce se skládá ze dvou celků zaměřených na bioanalytické hodnocení 1) vybraných protinádorových látek a 2) potenciálních kardioprotektiv.

V první části je popsáno použití mikroextrakce na pevnou fázi (SPME) jako alternativní metody pro stanovení vaznosti na plazmatické proteiny u thiosemikarbazonu DpC. Vhodnost optimalizovaného postupu byla ověřena zhodnocením opakovatelnosti, linearity a výtěžnosti extrakce z PBS pufru nebo plazmy. Výsledky *in vitro* stanovení ukázaly, že DpC se výraznou měrou váže na proteiny v plazmě, což koresponduje s hodnotami dříve publikovanými pro další thiosemikarbazon Dp44mT.

Další část je zaměřena na vývoj rychlé UHPLC-MS metody pro stanovení antracyklinu daunorubicinu (DAU) a jeho metabolitu v různých biologických matricích, umožňující studium osudu DAU při inkubaci s donorem NO - molsidominem, respektive jeho aktivní formou SIN-1 *in vitro*. Při experimentech bylo pozorováno, že SIN-1 ve vyšších koncentracích urychluje rozklad DAU, což s největší pravděpodobností stojí za neočekávaně nízkou cytotoxicitou DAU při inkubacích se srdečními i nádorovými buňkami.

Cílem třetí práce bylo vyvinout první UHPLC-MS metodu vhodnou pro současné stanovení proléčiva sobuzoxanu, jeho aktivní formy (ICRF-154) a metabolitu (EDTA-diamid) v biologickém materiálu. Na základě následné analýzy vzorků z *in vitro* hodnocení aktivace a metabolismu sobuzoxanu bylo vyvozeno několik důležitých závěrů. 1) V buněčném medium dochází k jeho pozvolnému rozkladu; 2) rychle proniká do srdečních buněk, kde je aktivně metabolizován na ICRF-154 a EDTA-diamid a 3) v plazmě je rychle rozkládán.

Dále bylo vyvinuto několik jednoduchých chromatografických metod s UV detekcí pro porovnání stability řady nově syntetizovaných aroylhydrazonových derivátů. Překvapivě se ukázalo, že substituce salicylaldehydové skupiny skupinou 2,6-dihydroxybenzaldehydovou nezvyšuje významně stabilitu hydrazonové vazby. Nejstabilnější derivát (látka 5) byl následně podroben zkouškám pro zjištění schopnosti chelatace a ochrany srdečních buněk před oxidativním působením nejrůznějších látek.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Mgr. Petra Reimerová

Supervisor: doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.

Title: Analysis of drugs and potential drugs in biological material using liquid chromatography

Bioanalytical methods play important role during development of new drugs. This is because determining the concentration of the drug of interest in biological matrices can help to reveal its mechanism of action, determine the values of basic pharmacokinetic parameters or study the fate of a potential drug during *in vitro* experiments. Considering the complexity of biological samples and low concentrations of studied compounds, the sample preparation prior to analysis is really important. Miniaturized techniques derived from standard extraction methods have significant presence in modern bioanalysis, mainly because they decrease both required sample volume and consumption of laboratory material to a minimum, and they enable automatization.

One of the main areas of drug discovery is currently the treatment of cancer. Unfortunately, development of highly efficacious drugs and prolongation of patient survival have resulted in the risk of developing late complications associated with anticancer treatment including serious side effect such as damage of the heart after anthracycline administration, leading in some cases to heart failure.

Experimental work of this thesis consists of 2 sections focused on bioanalytical evaluation of 1) selected anticancer agents and 2) potential cardioprotectants.

In the first part solid-phase microextraction is utilized as an alternative method for determination of plasma protein binding of thiosemicarbazone DpC. The suitability of the optimized protocol was verified by evaluating repeatability, linearity, and recovery of extraction from PBS buffer or plasma. The results of *in vitro* assay showed that DpC is highly bound to plasma proteins, which corresponds to the values previously published for other thiosemicarbazone Dp44mT.

Next part is focused on development of rapid UHPLC-MS method for determination of anthracycline daunorubicin (DAU) and its metabolite in various biological matrices, enabling *in vitro* study of the fate of DAU during incubation with NO-donor – molsidomine, more precisely its active form SIN-1. It was observed that SIN-1 at higher concentrations accelerates the degradation of DAU, which is most likely to be the cause of unexpectedly low cytotoxicity of DAU in incubations with both cardiac and tumour cells.

The aim of the third part of this work was to develop first UHPLC-MS method suitable for simultaneous determination of prodrug sobuzoxan, its active form (ICRF-154) and metabolite (EDTA-diamide) in biological samples. Based on the subsequent analysis of samples from the *in vitro* evaluation of sobuzoxan activation and metabolism, several important conclusions were drawn. 1) It gradually degrades in the cell culture medium; 2) readily penetrates into cardiac cells, where it is actively metabolized to ICRF-154 and EDTA-diamide and 3) it is rapidly decomposed in plasma.

Furthermore, several simple chromatographic methods with UV detection have been developed to compare the stability of a number of newly synthesized aroylhydrazone analogues. Surprisingly, it has been shown that substitution of a salicylaldehyde group with 2,6-dihydroxybenzaldehyde does not significantly increase stability of hydrazone bond. The most stable analogue (compound 5) was subsequently tested to determine its ability of chelating and protection of cardiac cells against the oxidative stress induced by various pro-oxidants.

OBSAH

1	Úvod.....	13
2	Teoretická část	15
2.1	Úprava vzorku před analýzou	15
2.1.1	Ředění	15
2.1.2	Precipitace proteinů (PPT - <i>protein precipitation</i>).....	15
2.1.3	Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE – <i>liquid - liquid extraction</i>)	16
2.1.4	Extrakce na pevnou fázi (SPE - <i>solid phase extraction</i>).....	17
2.1.5	Moderní trendy – miniaturizace	18
2.2	Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC).....	22
2.3	Hmotnostní detekce ve spojení s kapalinovou chromatografií	22
2.3.1	Ionizace za atmosférického tlaku	23
2.3.2	Analyzátory	26
2.3.3	Vnitřní standard.....	30
2.4	Vazba léčiv na plazmatické proteiny	31
2.4.1	Způsoby stanovení	32
2.5	Analyzované látky.....	38
2.5.1	Thiosemikarbazony	38
2.5.2	Antracykliny.....	39
2.5.3	Bisdioxopiperaziny	41
2.5.4	Aroylhydrazony.....	42
3	Cíle práce	45
4	Experimentální část – komentář k příloženým publikacím.....	46
4.1	Bioanalytické hodnocení protinádorových látek.....	46
4.2	Bioanalytické hodnocení nových látek s kardioprotektivním potenciálem.....	54
5	Závěr	63
6	Citovaná literatura.....	65
7	Seznam publikací zahrnutých v dizertační práci.....	77
8	Prezentace výsledků na konferencích	79
8.1	Přednášky	79
8.2	Plakátová sdělení.....	80
9	Účast v grantech.....	82
9.1	Hlavní řešitel	82
9.2	Člen kolektivu	82
10	Přílohy	83
10.1	Příloha číslo 1.....	84
10.2	Příloha číslo 2.....	97

10.3	Příloha číslo 3.....	112
10.4	Příloha číslo 4.....	125

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AGP	α_1 -kyselý glykoprotein
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i>)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (<i>atmospheric pressure photoionisation</i>)
ATL	T-buněčná leukémie dospělých
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
DAD	detektor s diodovým polem (<i>diode-array detector</i>)
DART	přímá analýza v reálném čase (<i>direct analysis in real time</i>)
DAU	daunorubicin
DESI	desorptivní ionizace elektrosprejem (<i>desorption electrospray ionization</i>)
DHBA	2,6-dihydroxybenzaldehyd
DI	extrakce při plném ponoření do vzorku (<i>direct immersion</i>)
DOL	daunorubicinol
Dp44mT	di-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon
DpC	di-2-pyridylketon-4-cyklohexyl-4-methyl-3-thiosemikarbazon
DPX	mikroextrakce pomocí plněných špiček (<i>disposable pipette extraction</i>)
ED	dialýza v rovnovážném stavu (<i>equilibrium dialysis</i>)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EDTA-diamid	2,2'-{(ethan-1,2-diyl)bis[(2-amino-2-oxoethyl)imino]}dioctová kyselina (metabolit ICRF-154)
EMA	Evropská léková agentura
ESI	ionizace elektrosprejem (<i>electrospray ionisation</i>)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léků (<i>Food and Drug Administration</i>)
GIT	gastrointestinální trakt
HF-LPME	mikroextrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna (<i>hollow fiber liquid-phase microextraction</i>)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HS	extrakce z prostoru nad vzorkem (<i>head space</i>)

HSA	lidský albumin (<i>human serum albumin</i>)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylamonio]-1-propansulfonát
ICRF-154	1,1'-ethylendi-3,5-dioxopiperazin
IDA	idarubicin
INH	izoniazid
IS	vnitřní standard
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LIT	lineární iontová past
LLE	extrakce kapaliny kapalinou (<i>liquid-liquid extraction</i>)
MALDI	laserová desorpční ionizace za účasti matrice (<i>matrix-assisted laser desorption ionization</i>)
m/z	poměr hmotnosti a náboje
MEPS	mikroextrakce pomocí plněné stříkačky (<i>microextraction in packed syringe</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie
MST-16	sobuzoxan
NVCM	neonatální ventrikulární kardiomyocyty (<i>neonatal ventricular cardiomyocytes</i>)
PALME	paralelní mikroextrakce pomocí umělých kapalných membrán (<i>parallel artificial liquid membrane extraction</i>)
PAN	polyakrylonitril
PEG	polyethylenglykol
PIH	pyridoxal isonikotinoyl hydrazon
PBS	fosfátový pufr (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PDMS	polydimethylsiloxan
PPB	vazba na plazmatické proteiny (<i>plasma protein binding</i>)
PPT	precipitace proteinů (<i>protein precipitation</i>)
PPY	polypyrrol
PTFE	polytetrafluorethylen
PVDF	polyvinylidenfluorid
QqQ	trojitý kvadrupól
QqTOF	hybridní analyzátor – kvadrupól s analyzátorem doby letu

RAM	materiály s omezeným přístupem (<i>restricted access materials</i>)
SA	salicylaldehyd
SALLE	vysolovací extrakce kapaliny kapalinou (<i>salting-out assisted LLE</i>)
SBSE	sorpční extrakce míchadlem (<i>stir-bar sorptive extraction</i>)
SDME	mikroextrakce do jedné kapky rozpouštědla (<i>single drop microextraction</i>)
SIH	salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon
SIL	značený stabilními izotopy (<i>stable isotope labelled</i>)
SIN-1	3-morfolinosydnonimin (aktivní metabolit molsidominu)
SLE	extrakce kapalinou podpořená pevnou fází (<i>supported liquid extraction</i>)
SPE	extrakce na pevnou fází (<i>solid phase extraction</i>)
SPME	mikroextrakce na pevnou fází (<i>solid phase microextraction</i>)
SRM	sken vybraných reakcí (<i>selected reaction monitoring</i>)
TOF	analyzátor doby letu
TOP II	topoizomeráza II
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie

1 Úvod

Mnohá rozhodnutí během vývoje léčiv jsou závislá na přesné kvantifikaci potenciálních léčiv v biologických vzorcích. Pro bioanalýzu je typické, že sledované látky jsou ve zkoumaných vzorcích ve velmi nízkých koncentracích (např. ng/ml nebo pg/ml) a v přítomnosti velkého množství balastních látek, často strukturně podobných. I proto se pro bioanalýzu léčiv staly standardem rychlé a robustní separační metody s citlivou a selektivní detekcí, mezi které poslední dobou patří především ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPLC-MS nebo lépe UHPLC-MS/MS) [1]. Bioanalýza má při vývoji léčiv velmi široké uplatnění a analytická metoda schopná stanovit koncentrace potenciálního léčiva v různých matricích je mnohdy jedním z předpokladů pro jeho úspěšný vývoj. Mezi hlavní oblasti využití bioanalýzy při vývoji léčiv patří např. analýza vzorků z preklinických, farmakokinetických (zjištění parametrů charakterizujících absorpci, distribuci, metabolismus a eliminaci léčiva) a bioekvivalenčních studií. Během následného klinického využití léčiv se bioanalytické metody používají například pro terapeutické monitorování léčiv (k optimalizaci podané dávky u konkrétního pacienta) a v oblasti toxikologie.

Nedílnou součástí vývoje potenciálně klinicky využitelných léčiv je studium jejich osudu v organismu. Jednou z důležitých charakteristik je pak vazba na plazmatické proteiny (PPB – *plasma protein binding*), která výrazně ovlivňuje jak pohyb léčiva v organismu, tak i jeho výslednou biologickou účinnost [2]. Mezi standardní metody pro stanovení vaznosti již tradičně patří dialýza a ultrafiltrace. V případě léčiv, která se nespecificky váží na membrány, je však využití těchto metod problematické. Proto je pozornost věnována také jiným „alternativním“ přístupům, včetně mikroextrakce na pevnou fázi [1].

Léčba nádorových onemocnění prochází neustálým vývojem ve snaze nalézt účinnější a selektivnější léčiva s menším počtem závažných nežádoucích účinků a překonat jedno z úskalí protinádorové terapie – vznik rezistence. Vzhledem k širokému spektru nádorových onemocnění existuje velké množství používaných léčiv s nejrůznějšími mechanismy účinku, z nichž většina je zacílena na buněčné pochody a potřeby rychle se dělících buněk.

Díky dostupnosti moderních protinádorových léčiv došlo k prodloužení doby přežití pacientů a mohly se tak začít projevovat pozdní komplikace protinádorové léčby. Jednou z nich je poškození srdce po podání antracyklinů vedoucí v některých případech až k srdečnímu selhání. Postupem času bylo navrženo několik strategií, jak tomuto nežádoucímu účinku bránit, zahrnující například omezení kumulativní dávky, změnu dávkovacího schématu nebo úpravu lékové formy. Jednou z dalších možností je současné podání kardioprotektiva. Vzhledem k tomu, že je dexrazoxan v současnosti jediným klinicky užívaným léčivem pro tuto indikaci, je věnována velká pozornost vývoji jeho analogů a případně proléčiv. Zkoušeny jsou ale také nové kardioprotektivní látky s odlišnou chemickou strukturou.

Ve své teoretické části tato práce zmiňuje základní techniky pro úpravu vzorků před analýzou s následným zaměřením na moderní trendy v miniaturizaci a obecné kapitoly zabývající se kapalinovou chromatografií ve spojení především s hmotnostní detekcí. Dále jsou zde popsány některé z metod pro stanovení vaznosti na plazmatické proteiny. Poslední část se zaměřuje na analyzované látky.

Experimentální část obsahuje komentář ke čtyřem odborným článkům publikovaným v časopisech s impakt faktorem a je rozčleněna na dvě tematické části. První část je zaměřena na vývoj bioanalytických metod pro analýzu vybraných protinádorových látek. Šlo o metody vhodné pro stanovení vaznosti na plazmatické proteiny u potenciálního léčiva ze skupiny thiosemikarbazonů a pro studium osudu daunorubicinu při *in vitro* experimentech zaměřených na výzkum možného kardioprotektivního působení donorů oxidu dusnatého (NO).

Druhá část experimentální práce je soustředěna na vývoj analytických metod pro stanovení potenciálních kardioprotektiv ze skupin bisdioxopiperazinů a aroylhydrazonů, jejichž výzkumu se naše skupina dlouhodobě věnuje. V rámci této práce byla vyvinuta první UHPLC-MS metoda vhodná pro stanovení koncentrací proléčiva sobuzoxanu, jeho aktivní formy (ICRF-154) a metabolitu (EDTA-diamid) v biologických matricích. Dále jsme vyvinuli několik jednoduchých chromatografických metod s UV detekcí vhodných pro sledování koncentrací derivátů salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu (SIH) v buněčném médiu. Tyto metody byly následně využity pro porovnání stability těchto nově syntetizovaných derivátů a SIH.

2 Teoretická část

2.1 Úprava vzorku před analýzou

Biologické vzorky jsou velice komplexní matrice obsahující kromě stanovovaných analytů i další látky, jako například proteiny, lipidy (fosfolipidy), soli a další organické sloučeniny, které jsou často svou strukturou a/nebo vlastnostmi velmi podobné analyzovaným látkám. Jelikož přítomnost těchto balastních látek může ovlivnit analýzu sledovaných látek (např. z hlediska selektivity), nebo dokonce poškodit instrument, je potřeba je před nadávkováním vzorku do chromatografického systému odstranit. K tomu slouží metody pro úpravu vzorku. Kromě odstranění balastních interferujících látek umožňují některé tyto metody také koncentrovat nebo izolovat sledovaný analyt. Schopnost zakoncentrování analytu je zvláště ceněna, jelikož se v biologických vzorcích většinou vyskytují ve velmi nízkých koncentracích oproti přítomným endogenním látkám.

2.1.1 Ředění

Vzorek je zředěn rozpouštědlem kompatibilním s následnou chromatografickou analýzou (mísitelným se vzorkem). Mezi výhody patří snadnost, rychlost a nízká cena. Tato metoda poskytuje 100% výtěžnost, ale za cenu nižší selektivity a citlivosti. Vzhledem k tomu, že nedochází k eliminaci žádných balastních látek ze vzorku, používá se tato metoda především pro jednoduché matrice s nízkým obsahem proteinů a lipidů, jako například moč, slzy nebo cerebrospinální tekutina, které nevykazují velký matricový efekt, nebo v případech, kdy není problémem nižší citlivost stanovení. [1].

2.1.2 Precipitace proteinů (PPT - *protein precipitation*)

K biologickému vzorku je přidáno precipitační činidlo, které vysráží přítomné proteiny. K denaturaci proteinů v matrici lze použít velké množství činidel. Mezi nejčastěji používaná činidla patří organická rozpouštědla (acetonitril, methanol, ethanol), dále pak silné kyseliny (trichloroctová, chloristá) nebo roztoky solí (síran amonný, síran zinečnatý). Množství přidaného srážedla by mělo být optimalizováno, ale obecně lze říci, že k odstranění > 90 % proteinů ze vzorku je třeba použít alespoň 1,5násobný objem acetonitrilu, 2,5násobný objem methanolu nebo 0,5násobný objem 10% kyseliny trichloroctové [1; 3]. Po přidání precipitačního činidla je vzorek krátce promíchán a centrifugován pro oddělení precipitátu a supernatantu, který je následně použit při

analýze. Metoda vyniká především svou jednoduchostí a rychlostí, což umožňuje zpracování velkého množství vzorků za krátký čas s minimální náročností na vybavení laboratoře. Je vhodná pro úpravu vzorků obsahujících jak hydrofilní, tak hydrofobní analyty. Nevýhodou bývá naředění vzorku, nižší selektivita a riziko matricových efektů, jelikož malé endogenní látky přechází do supernatantu. Je s výhodou využívána při analýze malých molekul rozdílných polarit ve vzorcích plazmy nebo séra [1].

2.1.3 Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE – *liquid - liquid extraction*)

Principem extrakce z kapaliny do kapaliny je rozdělování analytu mezi dvě nemísitelné kapaliny na základě hodnoty jeho rozdělovacího koeficientu oktanol-voda. Ke vzorku je přidáno několikanásobně větší množství s vodou nemísitelného rozpouštědla, do kterého látka přechází z vodného prostředí vzorku. Vzorkem je nejprve určitou dobu třepáno a následně je k oddělení vrstev použita centrifugace. Poměrná část organického rozpouštědla je odebrána, odfoukána pod proudem dusíku a zbytek je rekonstituován v menším množství rozpouštědla kompatibilního s chromatografickou metodou. Používanými extrakčními rozpouštědly jsou mimo jiné ethylacetát, hexan nebo halogenovaná rozpouštědla (1-chlorbutan, chloroform, dichlormethan). Při výběru rozpouštědla hrají důležitou roli především polarita, mísitelnost s vodou, těkavost a rozpustnost analytu [4]. V dnešní době se při výběru přihlíží také k dopadu na životní prostředí. Speciálním typem LLE je technika, která pro extrakci využívá s vodou mísitelné rozpouštědlo (například acetonitril) a k následnému oddělení organické fáze rozpouštědla od vzorku dochází přidáním koncentrovaného roztoku soli (SALLE - *salting-out assisted LLE*). S výhodou se tato metoda používá především pro zvýšení výtěžnosti u hydrofilních analytů. Novějším typem LLE je extrakce kapalinou podpořená pevnou fází (SLE – *supported liquid extraction*), která díky 96-jamkovému formátu umožňuje extrakci velkého množství vzorků za relativně krátký čas a současně omezuje vznik emulze a nutnost manuální manipulace na minimum. Principem je nanesení vzorku na inertní pevnou fázi s velkým množstvím pórů, která slouží jako prostředník mezi vodnou fází vzorku a přidáním rozpouštědlem nemísitelným s vodou [1].

U kyselých nebo bazických léčiv lze vhodnou úpravou pH vzorku (o 2 jednotky) potlačit ionizaci a zlepšit tak jejich přechod do organické fáze a zvýšit výtěžnost extrakce. Výrazně mohou extrakci ovlivnit také změna iontové síly vzorku, prodloužení doby extrakce, zvýšení objemu rozpouštědla (nebo lépe opakování extrakce menšími objemy)

a optimalizace třepání. Výhodami LLE jsou selektivita a získání velmi čistých extraktů s minimem balastních látek, dále pak relativně jednoduchý transfer metody a krátký čas nutný pro optimalizaci. Nevýhodami jsou naopak relativní časová náročnost a větší spotřeba organických rozpouštědel, možnost tvorby emulzí a omezené využití pro současnou extrakci analytů rozdílné polarit [1; 5]. Metoda je ideální pro selektivní extrakci nepolárních nebo mírně polárních analytů.

2.1.4 Extrakce na pevnou fázi (SPE - *solid phase extraction*)

Principem extrakce na pevnou fázi je interakce analytu se sorbentem a jeho zadržení na kolonce (analogicky s kapalinovou chromatografií), zatímco ostatní látky jsou vymyty ven. Při extrakci jsou používány větší částice sorbentu, což znamená že extrakce může probíhat za nižších tlaků [4; 6].

SPE při použití sorbentu s reverzní fází probíhá v několika typických krocích [1; 7]:

Kondicionace sorbentu – povrch sorbentu je aktivován promytím kolonky organickým rozpouštědlem (případně jeho směsí s vodou).

Promytí kolonky – nanesením vody nebo vodného pufru je odstraněno organické rozpouštědlo a kolonka je připravena na nanesení vzorku.

Nanesení vzorku – vzorek je aplikován na kolonku, prochází přes sorbent a analyt je zachycen na stacionární fázi.

Vymytí balastů – kolonka je promyta vodou nebo puftrem, čímž dojde k odstranění balastních látek z matrice, především proteinů, solí a vysoce polárních endogenních látek.

Eluce analytu – použitím vhodného rozpouštědla dojde k přerušení vazby analytu na sorbent a jeho vymytí z kolonky.

Průtok vzorku a činidel kolonkou je často urychlován použitím podtlaku [7].

Optimalizace SPE metody je často zdlouhavá a zahrnuje mimo jiné výběr typu a objemu sorbentu, promývacích a elučních činidel a podmínek (objem, doba) a případnou úpravu vzorku před jeho nanesením. Pro vymývání balastů je potřeba zvolit takové činidlo a postup, který zaručí, že nedojde k předčasnému vymytí analytu. Pro eluci analytů se nejčastěji používají acetonitril nebo methanol, případně ve směsi s vodou, do kterých se může přidat kyselina nebo zásada. SPE je možné provádět nejen off-line, ale také on-line napojením SPE kolonky na chromatografický systém přes speciálně upravený nástřikový ventil [1; 8]. Výhodami SPE jsou relativně vysoká selektivita, opakovatelnost, nižší

spotřeba organických rozpouštědel oproti LLE, možnost automatizace a použití on-line s HPLC a velká variabilita dostupných sorbentů/flexibilita podmínek. Nevýhodou je poměrně vysoká cena materiálu, jeho jednorázové použití a závislost analýzy na jeho kvalitě, potřeba speciálního zařízení a dlouhý čas potřebný pro optimalizaci podmínek [1; 9; 5].

2.1.5 Moderní trendy – miniaturizace

Jedním z důležitých trendů ve vývoji metod úpravy vzorku je **miniaturizace**. Jejím cílem je snížit objem spotřebovaných rozpouštědel i samotného vzorku, což je žádoucí především v bioanalýze, kde je množství vzorku dostupné pro analýzu většinou značně omezeno [10]. Extrakce jsou také často rychlejší a spojené se snadnější automatizací.

Nejčastěji jsou odvozené od LLE a SPE.

Mikroextrakční techniky odvozené od LLE

Jednou z prvních mikroextrakčních technik odvozených od LLE byla **mikroextrakce do jedné kapky rozpouštědla** (SDME – *single drop microextraction*) zavěšené na konci stříkačky umístěné do vodného vzorku. Po skončení extrakce je kapka vtažena do stříkačky. Výhodou je velké snížení spotřeby rozpouštědel a vysoký faktor obohacení vzhledem k velmi rozdílným objemům. Hlavní nevýhodou je nestabilita kapky při umístění jehly přímo do míchaného vzorku, projevující se sníženou opakovatelností extrakce. Lze ji ovlivnit snížením objemu stříkačky a úpravou její špičky nebo při analýze těkavých látek umístěním extrahující kapky nad vzorek („*head-space*“ mód) [10; 11]. Další možností pro stabilizaci rozpouštědla je využití dutého vlákna - **mikroextrakce v kapalně fázi pomocí dutého vlákna** (HF-LPME – *hollow fiber liquid-phase microextraction*). Rozpouštědlo je imobilizováno buď jen v pórech membrány tvořící duté vlákno, nebo může vyplňovat i vnitřní prostor. Poslední zmíněné uspořádání umožňuje vyplnění vnitřní dutiny rozpouštědlem mísitelným s vodou, do kterého je zpětně extrahován analyt z rozpouštědla v pórech. Podstatně se tím zvýší čistota výsledných extraktů. Přítomná membrána současně zamezuje průniku vysokomolekulárních látek ze vzorku [10].

Modifikací této metody vznikla **paralelní mikroextrakce pomocí umělých kapalných membrán** (PALME – *parallel artificial liquid membrane extraction*). Metoda pro extrakci používá 96-jamkovou destičku. Je založená na pasivní difúzi analytů přes umělou membránu obsahující v pórech organické rozpouštědlo, tvořící hranici mezi

vzorkem a akceptorovým médiem. S výhodou se zde používá úprava pH jak u vzorku, tak i akceptorového roztoku pro zlepšení přechodu analytu. Technika umožňuje současnou analýzu velkého množství vzorků a automatizaci a je plně kompatibilní s chromatografií na reverzních fázích [11; 12].

Mikroextrakční techniky odvozené od SPE

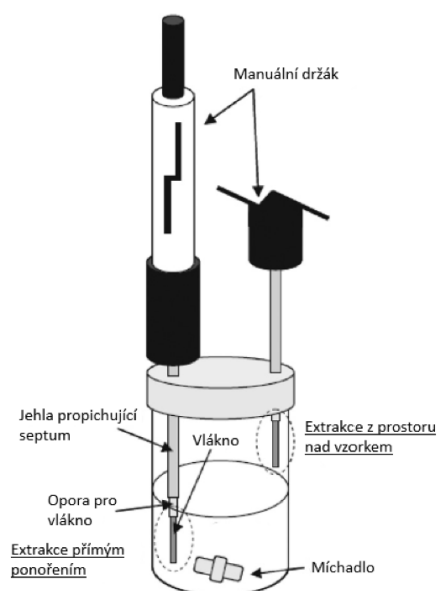
Umístěním sorbentu do kartridže stříkačky vznikla **mikroextrakce pomocí plněné stříkačky** (MEPS – *microextraction in packed syringe*). Postup extrakce sleduje běžný proces SPE (kondicionace, nanesení vzorku, promytí a eluce), jen je doplněn o regenerační krok, který umožňuje opakované použití sorbentu. Technika je vhodná pro velmi malé objemy vzorků a lze ji přímo spojit s chromatografickým systémem, což usnadňuje automatizaci. MEPS patří mezi velmi rychlé extrakční techniky a oproti mikroextrakci na pevnou fázi (SPME) nabízí vyšší extrakční účinnost [10; 13].

Další možností je umístění sorbentu do špičky pipety - **mikroextrakce pomocí plněných špiček** (DPX - *disposable pipette extraction*), a to buď volně a nebo mezi dvě frity. Jednotlivá uspořádání se liší nanesením roztoků – v prvním případě jsou roztoky do špičky nasávány přes sorbent, ve druhém jsou aplikovány přes horní fritu a sorbentem prochází díky zvýšenému tlaku nebo odstředivé síle. V současné době je k dispozici poměrně široké spektrum sorbentů a příprava špiček je po počátečním zaučení relativně jednoduchá. Metoda je rychlá, umožňuje paralelní extrakce více vzorků a poskytuje vysokou výtěžnost, oproti MEPS však nelze špičky používat opakovaně [10; 14].

Pro **sorpční extrakci míchadlem** (SBSE – *stir-bar sorptive extraction*) je sorbent (velmi často polydimethylsiloxan – PDMS) nanesen na magnetickém míchadle, kterým je vzorek současně míchán. Po extrakci je míchadlo jednoduše z roztoku vyjmuto a opláchnuto. Desorpce může probíhat buď za zvýšené teploty (přímé spojení s plynovou chromatografií) nebo zpětnou extrakcí malým množstvím rozpouštědla. Vzhledem k tomu, že na míchadlo lze oproti SPME nanést silnější vrstvu sorbentu, vyznačuje se tato metoda zvýšenou kapacitou a výtěžností. Nevýhodou je manuální provedení extrakce [10; 15].

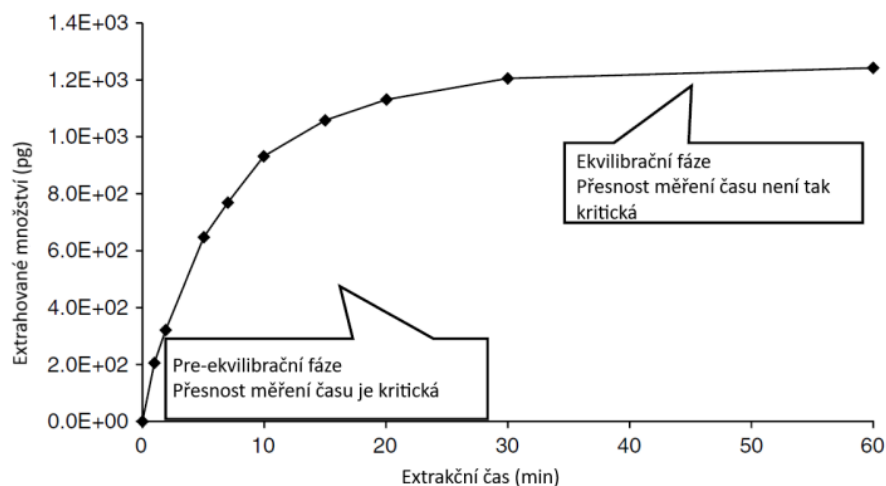
Mezi první mikroextrakční metody odvozené od SPE patřila **mikroextrakce na pevnou fázi** (SPME – *solid-phase microextraction*), vyvinutá v devadesátých letech Pawliszynem. Malé množství sorbentu naneseného na vlákne je vystaveno vzorku na přesně stanovenou dobu. Pro následnou desorpci analytu se používá zvýšená teplota

(přímé spojení s plynovou chromatografií), nebo extrakce do malého množství rozpouštědla. Vlákno se sorbentem bývá do vzorku přímo ponořeno (DI – *direct immersion*), nebo může být umístěno do prostoru nad vzorek (HS – *head space*) (obrázek 1) [16; 11].



Obr. 1 - Schematické znázornění SPME (převzato [17] a upraveno)

Analyt je ze vzorku extrahován až do dosažení rovnováhy (obrázek 2) mezi jeho volnou koncentrací a množstvím navázaným na sorbentu, čímž se liší od klasické SPE (snaha extrahovat veškerý analyt). SPME se tedy řadí mezi rovnovážné extrakce. Vzhledem k minimálnímu objemu sorbentu při ní většinou nedojde k výraznému úbytku analytu nebo jeho úplné extrakci. Extrakce tak nenaruší rovnováhu mezi volnou a vázanou frakcí ustanovenou ve vzorku (plazma, plná krev), a je proto mimo jiné vhodná pro stanovení volné koncentrace léčiv v plazmě. Současně je od určitého objemu vzorku extrahované množství prakticky nezávislé na tomto objemu, což umožňuje SPME použít v případech, kdy přesný objem vzorku není znám (environmentální analýza nebo stanovení koncentrací *in vivo*) [16; 17; 18; 19].



Obr. 2 - Modelový příklad extrakčního profilu při použití SPME (převzato [18] a upraveno)

Výhodami SPME jsou jednoduchost, rychlost, minimální spotřeba rozpouštědel a vzorku, relativně nízká cena a snadná automatizace, opakované použití, možnost extrakce ze složitých matic a minimální maticové efekty. Nevýhodami mohou být vyšší závislost extrahovaného množství na objemu sorbentu (tj. opakovatelné přípravě vlákna se sorbentem) a zkušenostech operátora a v některých případech nižší citlivost (související s malou kapacitou sorbentu) [16; 10; 18].

Jedním z hlavních omezení použití SPME pro extrakci biologických vzorků je trvalé navázání proteinů ze vzorku na sorbent (označované jako „*fouling*“), jež snižuje extrakční účinnost. Použitím biokompatibilních sorbentů (např. polyakrylonitril – PAN, polyethylenglykol – PEG, polypyrrol – PPY nebo materiály s omezeným přístupem - RAM) však dochází k omezení tohoto efektu [20; 21].

Účinnost a spolehlivost SPME ovlivňuje velké množství faktorů, mezi které patří například typ a šířka vrstvy sorbentu, použitý mód (HS vs. DI), způsob a rychlost třepání při extrakci, pH vzorku a obsah solí, obsah vody (ředění vzorku) a organického rozpouštědla, teplota, hloubka ponoření vlákna do vzorku a v neposlední řadě samozřejmě extrakční čas. Na opakovatelnost má mnohem větší vliv, jsou-li všechny faktory během následných extrakcí konstantní než samotné dosažení rovnovážného stavu. Velmi důležité je přesné odměření času, a to zejména při manuální manipulaci s vláknem a extrakci v pre-ekvilibrační části extrakční křivky (viz obrázek 2) [18].

2.2 Ultravysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

Kapalinová chromatografie (LC) patří především díky své robustnosti a flexibilitě mezi nejpoužívanějších separační techniky ve farmaceutické analýze.

Již v 70. letech minulého století tehdejší autority v oblasti chromatografie předpověděly, že ultrarychlá LC bude vyžadovat částice o velikosti 1-2 μm a krátké kolony (20-40 mm) [22]. Zmenšením částic dojde ke snížení odporu proti převodu hmoty, jelikož analyt nemusí urazit tak dlouhou dráhu, a ke zploštění van Deemterovy křivky. Pro úspěšnou separaci tak lze využít širší rozmezí lineárních průtokových rychlostí při zachování stejné separační účinnosti, což umožní zkrácení kolony [23]. Vzhledem k tomu, že to znamenalo podstatné snížení objemu kolony oproti dosavadnímu, bylo žádoucí, aby ruku v ruce s vývojem nových částic následoval i vývoj samotné instrumentace, který začal především u způsobu nástřiku vzorku na kolonu (potřeba rychlého a přesného dávkování velmi malých objemů) a detektoru (nutnost menší cely detektoru a rychlejšího sběru dat). Dále bylo třeba, aby byly nové přístroje schopny odolat vysokému zpětnému tlaku a měly co nejkratší spoje mezi jednotlivými součástmi, zaručující malý mrtvý objem. Tento vývoj trval dalších 20-30 let, než byly v roce 2004 na trh uvedeny první kolony s částicemi menšími než 2 μm a odpovídající instrumentace firmou Waters [22; 24]. Pro vysokou separační účinnost umožňující zkrácení analýzy začala být UHPLC velmi vyhledávanou technikou také ve farmaceutické analýze, kde je velká poptávka po metodách umožňujících za krátký čas změřit velké množství vzorků obsahujících složité směsi analytů (např. v oblastech toxikologie a monitorování lékových hladin, dopingové kontroly i environmentální analýzy). Stejně tak farmaceutické firmy během vývoje a výroby léčiv potřebují rychlé a selektivní metody kromě jiného pro zkoušky totožnosti a čistoty při výrobě léčiv a výstupní kontrolu léčivých přípravků, dále pak pro stabilitní studie a analýzu vzorků z preklinických a klinických studií [22; 25].

V kombinaci s hmotnostní detekcí poskytuje UHPLC vysokou selektivitu a přesné a citlivé stanovení malých množství analytů ve vzorcích.

2.3 Hmotnostní detekce ve spojení s kapalinovou chromatografií

Spojení hmotnostní detekce s kapalinovou chromatografií nebyl jednoduchý proces především kvůli potřebě překonat potíže vznikající při zavedení kapaliny do oblasti vakua. Narozdíl od spojení s plynovou chromatografií k tomu došlo až o několik desítek

let později. Vývoj ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku zapříčinil velký posun v této oblasti a hmotnostní detekce začala být hojně využívána i ve farmaceutické analýze [26; 27].

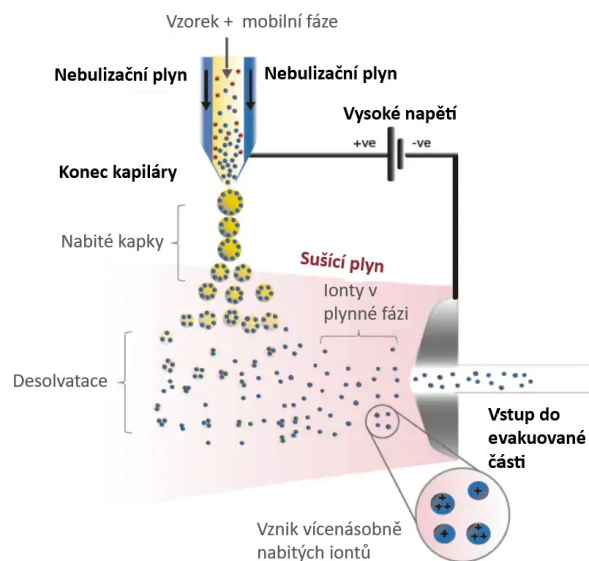
Hmotnostní spektrometrie (MS) je schopna poskytnout informace o chemické struktuře analytu (na základě zjištěných poměrů m/z a fragmentaci při tandemové MS). Je také ceněna pro svou selektivitu a citlivost. Na druhou stranu při jejím spojení s LC jsou kladeny vyšší nároky na složení mobilní fáze a používání vnitřních standardů, než tomu bývá při užití např. spektrofotometrické detekce [28].

Při spojení s UHPLC je důležitá i rychlost skenování.

V **iontovém zdroji** hmotnostního spektrometru dochází za atmosférického tlaku k převodu mobilní fáze a analytů do plynné fáze a ionizaci molekul. Následně jsou vzniklé ionty převedeny do evakuované části přístroje (udržované pomocí **vakuových pump**) a s pomocí **iontové optiky** jsou nasměrovány do **analyzátoru**, kde jsou rozlišeny poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Nakonec jsou ionty převedeny vhodným **detektorem** (elektronásobič, fotonásobič, Faradayova klec) na elektrický signál, který je současně zesílen, zaznamenán a zobrazen v podobě MS spektra dle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) [28].

2.3.1 Ionizace za atmosférického tlaku

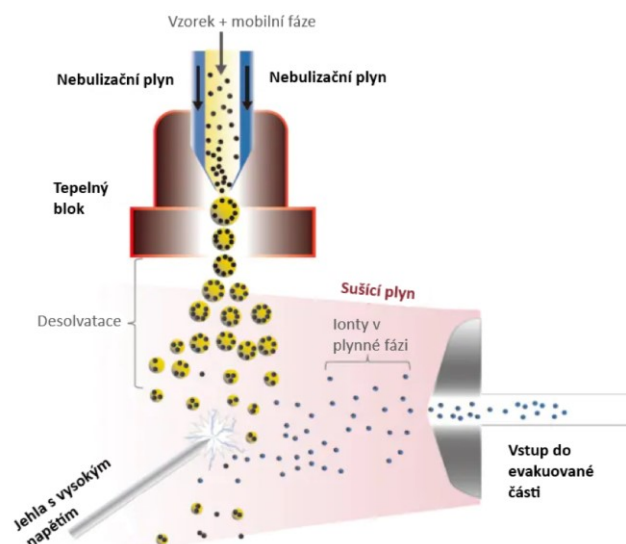
Jednou z nejpoužívanějších technik v kombinaci s kapalinovou chromatografií je **ionizace elektrosprejem** (ESI – *electrospray ionisation*, obrázek 3). Mobilní fáze s analyty, vstupující do vyhřívaného zdroje, je zmlžována proudem plynu – nejčastěji dusíku a přítomné vysoké napětí mezi koncem kapiláry a protější elektrodou udává vzniklým kapkám náboj. Následným odpařováním mobilní fáze se náboj kumuluje až dojde k tzv. Coulombické explozi, rozpadu kapek a tvorbě samostatných iontů (s jedním nebo více náboji). Přítomnost více nábojů na jednom iontu umožňuje díky snížení poměru m/z analyzovat molekuly o velké molekulové hmotnosti (typicky peptidy a proteiny) běžně používanými analyzátory s limitovaným rozsahem měřených m/z . Při přechodu iontů do evakuované části může docházet k tvorbě klastrů. Prevencí před jejich vznikem je použití protiproudu dusíku jako sušícího plynu a vyhřívání kapiláry [27; 29; 26; 28].



Obr. 3 – Schematické znázornění procesu a princip ESI (převzato [30] a upraveno)

Technika je vhodná pro ionizaci středně polárních až polárních analytů (včetně peptidů a proteinů) a lze ji s výhodou kombinovat s LC na reverzních fázích [28; 31]. Určitou nevýhodou ESI je vyšší citlivost k matricovým efektům. Potlačení nebo naopak zvýšení intenzity signálu může být způsobeno přítomností netěkavých látek ve vzorku, které interferují s ionizací analytu. Bylo navrženo několik možných řešení, jak matricovým efektům předcházet: 1) použití vhodné úpravy vzorku před analýzou (upřednostňují se extrakce kapaliny kapalinou nebo extrakce na pevnou fázi); 2) úprava chromatografických podmínek tak, aby docházelo k oddělení analytu a interferující látky; 3) přepnutí do negativního módu umožňujícího ionizaci menšího množství látek (včetně omezení ionizace těch interferujících); 4) snížení množství vzorku vstupujícího do iontového zdroje (např. naředěním nebo snížením nástřiku, použitím nanoelektrospreje); nebo 5) použití izotopicky značeného vnitřního standardu, který je schopen vliv matricového efektu kompenzovat [31].

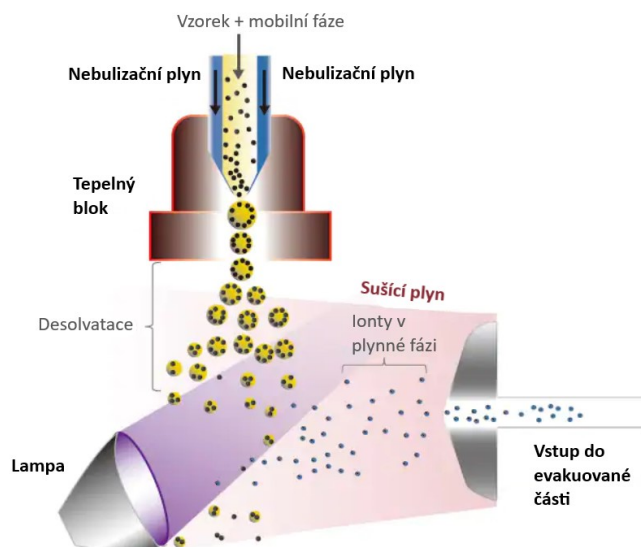
Další používanou technikou v kombinaci s LC je **chemická ionizace za atmosférického tlaku** (APCI - *atmospheric pressure chemical ionisation*, obrázek 4). Přiváděná mobilní fáze s analyty je ve zdroji zmlžena proudem dusíku a kapalina je rychle odpařena. Následně prochází prostorem s kovovou jehlou, na kterou je přivedeno vysoké napětí vytvářející koronový výboj. Tam nejprve dochází k ionizaci mobilní fáze (protože je v nadbytku) a následně je náboj předáván molekulám analytu. Proces ionizace je stejný jako u chemické ionizace, jen probíhá za atmosférického tlaku. Na rozdíl od ESI zde dochází k ionizaci až v plynné fázi [26; 31].



Obr. 4 – Schematické znázornění procesu a princip APCI (převzato [30] a upraveno)

Metoda je používána při analýze málo polárních až nepolárních analytů o střední molekulové hmotnosti (přibližně 1 500 Da). Výhodou je také možnost použití vyšších průtoků mobilní fáze a možnost kombinace s chromatografií na normálních fázích [31]. Oproti ESI je technika méně citlivá k matricovým efektům, což je dáno rozdílným principem ionizace [32; 33]. Je také méně šetrná v porovnání s ESI, protože během ionizace může docházet k nechtěné fragmentaci nebo rozpadu termolabilních látek [26].

Modifikací této techniky představuje **fotoionizace za atmosférického tlaku** (APPI - *atmospheric pressure photoionisation*, obrázek 5), která je už používána o poznání méně. Pro ionizaci molekul je zde místo jehly s koronovým výbojem použit zdroj UV záření. Selektivitu ionizace pomocí APPI lze ovlivnit zvolenou energií emitovaného fotonu (vyšší než analytu, ale nižší než přítomných plynů a rozpouštědel). Pro zvýšení tvorby iontů je u některých látek vhodné použít dopant (např. toluen nebo aceton), který je schopen předat získaný náboj analytu. Metoda se používá pro ionizaci nepolárních látek o střední molekulové hmotnosti (přibližně 2 000 Da), pro které není vhodná ESI ani APCI. Díky jisté selektivě ionizace je méně citlivá k matricovým efektům [31; 27].



Obr. 5 - Schematické znázornění procesu a princip APPI (převzato [30] a upraveno)

Existují také další ionizační techniky, avšak nebývají používány ve spojení s kapalinovou chromatografií. Přesto i tyto techniky nacházejí své uplatnění ve specifických oblastech výzkumu. Za zmínku stojí laserová desorpční ionizace za účasti matrice (MALDI – *matrix-assisted laser desorption ionization*), používaná především při analýze vysokomolekulárních látek (peptidy, proteiny, lipidy, DNA), nebo ambientní techniky - např. desorptivní ionizace elektrosprejem (DESI – *desorption electrospray ionization*) a přímá analýza v reálném čase (DART – *direct analysis in real time*), které umožňují vzorkování za atmosférického tlaku bez předchozí úpravy vzorku. Jsou využívány pro rychlou analýzu vzorků v terénu – např. analýza výbušnin a nádorové tkáně. DESI je možné také použít pro přímé mapování přítomnosti analytu na površích nebo jednotlivých vrstvách vzorku [27; 26].

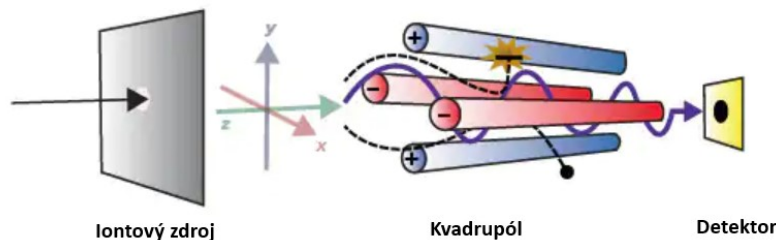
2.3.2 Analyzátoary

V analyzátoary dochází k rozdělení iontů ve vakuu dle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) předtím, než mohou být detekovány. Jednotlivé analyzátoary se mezi sebou liší jak principem dělení iontů, tak rozsahem měřených hodnot m/z , rozlišovací schopností, možností provádět MS^n experimenty, velikostí a cenou.

Kvadrupólový analyzátoary

Kvadrupólový analyzátoary využívá pro separaci iontů stabilitu jejich oscilačních trajektorií v elektrickém poli (obrázek 6). Je utvářen čtyřmi paralelními tyčemi s kruhovým nebo hyperbolickým průřezem, na které je vloženo střídavé a stejnosměrné napětí (na dvě tyče kladné a na dvě záporné napětí). Pokud procházející ionty oscilují v souladu

s nastaveným elektrickým polem, jsou propuštěny na detektor. V opačném případě se vybijí na některé z tyčí. Postupnou změnou napětí lze docílit změření všech iontů v určitém rozsahu m/z [27; 26; 34].



Obr. 6 – Schematické znázornění kvadrupólu (převzato [35] a upraveno)

Tento analyzátor je velmi oblíbený pro svou jednoduchost, rychlost měření a nízkou cenu. Nevýhodami jsou nízká správnost určení m/z ($0,1 m/z$) a limitovaný rozsah měřených hodnot [34].

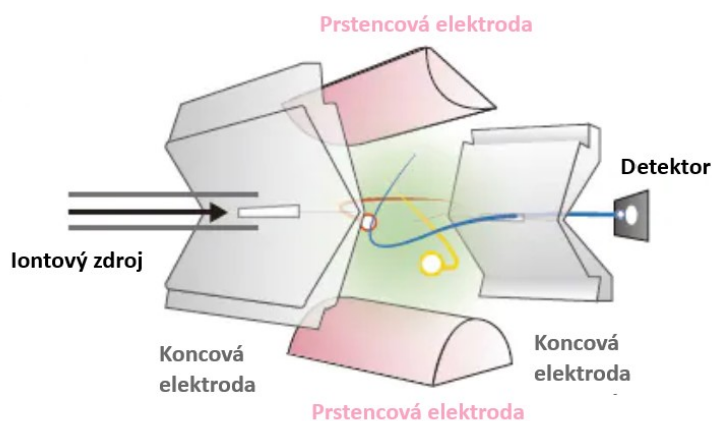
V kvantitativní analýze se pro svou selektivitu, přesnost a rychlost velmi často využívá spojení tří kvadrupólových analyzátorů za sebou (**trojitý kvadrupól - QqQ**), z nichž prostřední funguje jako kolizní cela, kde dojde v přítomnosti neutrálního plynu (argon, dusík) k fragmentaci vybraného iontu. Produktové ionty jsou následně děleny dle jejich m/z v posledním kvadrupólu [34; 27]. Lze tak použít **skan vybraných reakcí** (SRM – *selected reaction monitoring*), který sleduje fragmenty vznikající rozpadem specificky vybraného iontu analytu. To umožňuje zvýšit selektivitu stanovení a zachovat jeho citlivost. Pro strukturní analýzu lze například využít skan neutrálních ztrát (ztráta definované m/z typické pro určitou skupinu látek) nebo skan produktových iontů (všechny fragmenty vznikající z vybraného prekurzorového iontu) [26].

Dále se jednoduché kvadrupóly používají jako iontové filtry a kolizní cely ve spojení s dalšími analyzátory – nejčastěji s analyzátorem doby letu (QqTOF). Jejich spojením vzniká hybridní analyzátor s vysokou přesností určení hmoty používaný pro strukturní analýzu [36].

Iontová past

Iontová past využívá oscilující elektrické pole k zadržení iontů. Dostupné jsou 2 varianty iontových pastí (trojrozměrná iontová past - 3D-IT a lineární iontová past - LIT), lišící se geometrickým uspořádáním elektrod a s ním spojenou kapacitou. 3D-IT (obrázek 7) je tvořena jednou prstencovou a dvěma koncovými elektrodami, které společně tvoří

prostor, kde jsou pomocí vhodného poměru napětí zadrženy ionty. Změnou tohoto napětí jsou ionty postupně vypuzeny směrem k detektoru nebo je určitý ion vybrán a fragmentován. LIT je uspořádáním velmi podobná kvadrupólu, jen je na obou koncích zakončena elektrodami s vloženým potenciálem, které umožňují zadržení iontů. Ve srovnání s 3D-IT se vyznačuje vyšší kapacitou a je méně náchylná ke vzniku prostorového náboje. To zvyšuje její citlivost a dynamický rozsah [27; 26].

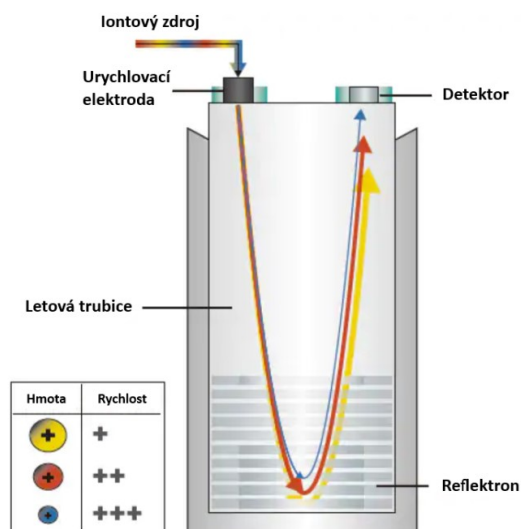


Obr. 7 – Schematické znázornění trojrozměrné iontové pasti (převzato [35] a upraveno)

Vzhledem k nízkým hodnotám správnosti určení m/z a rozlišení je IT srovnatelná s kvadrupólem. Pro svou citlivost a možnost provedení MS^n experimentů se používá spíše pro kvalitativní analýzu [27; 36].

Analyzátor doby letu

Analyzátor doby letu (TOF) dělí ionty na základě rozdílné doby, kterou potřebují k překonání určité dráhy, po jejich urychlení napěťovým pulzem. Na začátku letové trubice je všem iontům dodána stejná kinetická energie. Iontům s nižší m/z je tak udělena vyšší rychlost a dorazí do detektoru dříve než ionty s vyšší m/z (obrázek 8). TOF je schopný detekovat široké rozmezí m/z v závislosti na délce analýzy a letové trubice, je ale limitován nižší rozlišovací schopností z důvodu určité distribuce počátečních energií iontů o stejné m/z . Rozlišovací schopnost lze zvýšit použitím reflektromu (elektrostatického iontového zrcadla), který slouží ke sjednocení kinetických energií iontů se stejnou m/z . Ionty stejné m/z tak dopadnou na detektor ve stejnou chvíli.



Obr. 8 – Schematické znázornění analyzátoru doby letu s reflektorem (převzato [35] a upraveno)

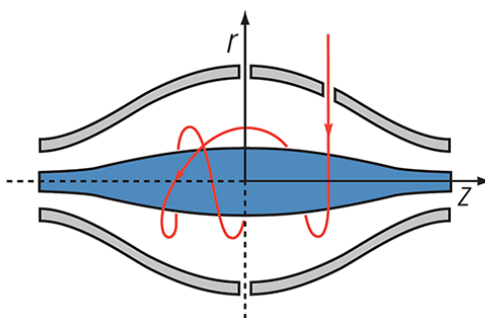
Výhodou oproti kvadrupólu je, že při dostatečném času analýzy se nakonec všechny ionty dostanou až do detektoru, což v praxi znamená širší rozsah měřených hodnot m/z [26; 34].

Vzhledem k pulznímu principu tohoto analyzátoru a širokému rozmezí hodnot m/z je velmi často spojován s MALDI ionizací při analýze velkých biomolekul. Při spojení s ostatní typy ionizace se pro postupné dávkování do analyzátoru používá pulzní elektroda.

Spojením s kvadrupólem vzniká hybridní analyzátor (QqTOF) vynikající především rozlišením, citlivostí a rozsahem měřených m/z hodnot.

Elektrostatická orbitální past (Orbitrap)

Jedná se o nejnovější analyzátor typu pasti, který zaznamenává všechny hodnoty m/z paralelně a pro získání výsledného spektra používá matematický výpočet. Skládá se z vnitřní vřetenovité a vnější elektrody (obrázek 9). Vpuštěné ionty vytvoří prsteneček kolem vnitřní elektrody a začnou podél ní oscilovat. Indukovaný proud je následně Fourierovou transformací převeden na záznam hmotnostního spektra. K zaznamenání signálu tedy není potřeba speciální detektor. Před vstupem do samotné orbitální pasti jsou ionty soustředěny v tzv. C-pasti („zahnutý kvadrupól“), což zaručuje rychlé dávkování a zlepšuje výslednou detekci. V praxi se také může kombinovat s LIT nebo kvadrupólem [27].



Obr. 9 – Schematické znázornění orbitální pasti (převzato [37] a upraveno)

Orbitrap vyniká především vysokým rozlišením a vysokou správností určení m/z . Vzhledem k malé velikosti a relativní cenové dostupnosti je vhodnou alternativou k iontové cyklotronové rezonanci [38].

2.3.3 Vnitřní standard

Při úpravě složitých biologických vzorků a následné LC-MS analýze může docházet k nejrůznějším drobným odchylkám (např. ve výtěžnosti extrakce, objemu nástřiku, účinnosti ionizace v iontovém zdroji) mezi jednotlivými měřeními, které mohou způsobit nepřesnosti v určení množství analytu a snížit tak spolehlivost tohoto stanovení [1].

Přidáním stejného množství vnitřního standardu (IS) do všech vzorků a standardů lze omezit vliv těchto odchylek na výsledné stanovení, zvýšit jeho přesnost a preciznost a zlepšit spolehlivost bioanalytické metody [1].

Jako IS se vybírají látky se strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi (lipofilita, schopnost ionizace) co nejbližšími zkoumanému analytu tak, aby byly schopné svým chováním napodobit analyt ve všech částech analýzy. Pokud je to možné, volí se jako vnitřní standard analyt značený stabilními izotopy (SIL – *stable isotope labelled*) – ^{13}C , ^{15}N , deuterium. Dalšími podstatnými vlastnostmi IS jsou jejich čistota a stabilita [1]. I když jsou izotopicky značené vnitřní standardy pro analýzu vhodnější a žádanější, nejsou bohužel často komerčně dostupné a jsou značně drahé. V těchto případech se používá se vhodný strukturální analog. [39].

Vnitřní standard se přidává ke vzorku co nejdříve, většinou ještě před úpravou vzorku. Jen tak může přispět ke kompenzaci variability ve všech částech metody. Pokud to ale není možné, jako například při stanovení volné a vázané frakce, kdy by mohl narušit ustanovenou rovnováhu, lze jej přidat během některého z následných kroků analýzy [1].

Důležité je i správně zvolit koncentraci IS, protože může ovlivnit linearitu, přesnost a preciznost stanovení. Ačkoli neexistuje žádný konsenzus, v bioanalýze se nejběžněji

využívají koncentrace IS v okolí 30 – 50 % horního limitu kvantifikace analyzované látky [1; 39].

V případě použití IS pro kompenzaci matricových efektů při ionizaci analytu ve zdroji je výhodné, pokud jsou retenční časy analytu a IS prakticky shodné a píky se překrývají. I když to klade větší nároky na zajištění následného odlišení analytu a IS v analyzátoru pomocí rozdílných SRM, vliv interferujících látek na ionizaci by měl být u obou stejný. Tento předpoklad splňují především izotopicky značené IS. Pro deuterované IS byl nicméně v některých případech pozorován vliv izotopu na chromatografické chování ústící v drobnou odchylku v retenčním čase, a proto jsou upřednostňovány IS značené ^{13}C , ^{15}N [39; 34].

2.4 Vazba léčiv na plazmatické proteiny

Vazba na proteiny v plazmě umožňuje přenos léčiv v krvi až do místa účinku/metabolické přeměny/eliminace a představuje tak pro ně přechodné depo v organismu. Je to reverzibilní, rychlý, rovnovážný a do jisté míry nasýtitelný proces. Může mít výrazný vliv na farmakokinetiku (distribuci, metabolismus a eliminaci) a farmakodynamiku léčiva ovlivněním jeho volné frakce, která může difundovat přes membrány (cévní stěna, hematoencefalická membrána a další), kumulovat se ve tkáních a dosáhnout místa účinku [1; 40; 41]. Právě kvůli úzkému vztahu mezi koncentrací volného léčiva a jeho výsledným farmakologickým (toxikologickým) účinkem se její stanovení stalo jednou ze základních sledovaných charakteristik při vývoji léčiv [42].

Míra vaznosti konkrétního léčiva na plazmatické proteiny je závislá na mnoha faktorech, mezi něž patří například chemická struktura léčiva, lipofilita a afinita k vazebnému místu. Důležitou charakteristikou je také kinetika vazby. U některých molekul lze ustáleného stavu mezi volnou a vázanou frakcí dosáhnout během několika minut, u jiných to ale může trvat i několik hodin. Stejně tak může mít na hodnotu vaznosti vliv koncentrace léčiva, zvláště může-li dojít k nasycení vazebných míst. Dále je vaznost ovlivněna také kompeticí o vazebné místo s jinými látkami [1; 20].

Vaznost na proteiny je většinou vyjadřována v % vázaného léčiva z celkové koncentrace léčiva v plazmě.

Léčiva se v krvi váží s různou afinitou na výrazněji zastoupené plazmatické proteiny (např. albumin, kyselé glykoproteiny, lipoproteiny). V plazmě se ale vyskytují i proteiny specifické pro vazbu určitých látek, například hormonů nebo iontů kovů (transkordin,

globulin vázící tyroxin, transferin). Na tvorbě vazby se většinou podílí hydrofobní vazby, van der Waalsovy síly nebo iontové vazby [2; 43]

Albumin (HSA – *human serum albumin*), jehož fyziologická koncentrace je přibližně 600 μM , má vysokou vazebnou kapacitu vzhledem k většímu množství vazebných míst na své povrchu a je schopen vázat široké spektrum endogenních i xenobiotických molekul. Přednostně však váže léčiva s kyselými funkčními skupinami nebo léčiva neutrální [44; 43]. Někdy je při experimentech nahrazován hovězím sérovým albuminem (BSA – *bovine serum albumin*).

α_1 -kyselý glykoprotein (AGP – *α_1 -acid glycoprotein*) s fyziologickou koncentrací 12 – 30 μM patří mezi proteiny s vysokou afinitou a nízkou kapacitou. Váže převážně bazická a neutrální léčiva. Řadí se mezi proteiny akutní fáze, a tak se jeho koncentrace může výrazně měnit při některých patologických stavech (zánět, nemoc). Jeho vaznost může být dále výrazně ovlivněna například pohlavím, věkem, etnickou příslušností, těhotenstvím nebo obezitou. Vzhledem k jeho nižší koncentraci a jejím velkým fluktuacím je velmi často podezříván z odpovědnosti za klinicky relevantní lékové interakce [2; 44].

Vzhledem ke složitosti vazby léčiv na plazmatické proteiny se doporučuje k jejímu experimentálnímu stanovení používat plazmu nebo sérum, které obsahují všechny dané vazebné proteiny a zjištěná hodnota proto bude nejlépe odpovídat skutečnému chování látek *in vivo* [40]. Pro zjednodušení stanovení nebo bližší specifikování proteinů, na které se dané léčivo váže, lze při experimentech použít roztok jednoho proteinu (nejčastěji HSA, BSA nebo AGP).

2.4.1 Způsoby stanovení

K určení vaznosti na proteiny lze použít hned několika metod z většiny založených na 2 základních principech – separaci volné a vázané frakce nebo změně fyzikálně-chemické vlastnosti ligandu nebo proteinu v důsledku vzniku vazby. Ve většině případů se donedávna používala jedna ze 3 základních metod: rovnovážná dialýza, ultrafiltrace nebo ultracentrifugace. Dále lze využít i některou z méně používaných technik jako například afinitní chromatografii [45; 46], mikroextrakci na pevnou fázi (SPME) [40; 20], kapilární elektroforézu [47; 48], nebo kalorimetrické metody [49]. Speciální postavení mají spektroskopické metody (např. nukleární magnetická rezonance [50] nebo fluorescence [51; 52; 53]), jejichž výhodou je, že umožňují, kromě určení konstanty vaznosti,

porozumět vlastnímu mechanismu vaznosti, identifikovat vazebné místo a poskytnout informaci o jeho 3D struktuře. Jsou využívány především u vazebných míst s vysokou afinitou. Rozšíření jejich užití limituje především nízká citlivost, nutící k měření při vysokých koncentracích léčiva, což může vést k agregaci nebo problémům s rozpustností [54].

Při stanovení vaznosti léčiv na proteiny *in vitro* je důležité zohlednit několik základních aspektů. Vaznost látek se může lišit při použití plazmy nebo jejích laboratorních náhrad (roztok HSA nebo BSA), jelikož léčivo se může vázat hned na několik typů proteinů a mastné kyseliny přítomné v plazmě mohou ovlivňovat dostupnost vazebných míst. Stejně tak se vaznost liší u jednotlivých živočišných druhů a u zdravých a nemocných populací. Proto je třeba při porovnání hodnot velmi pečlivě sledovat metodiku stanovení [44].

Při výběru metody je třeba zohlednit ještě další parametry, jako jsou například fyzikálně-chemické vlastnosti (včetně lipofility), stabilita léčiva v plazmě a adsorpce na povrchy. Pokud léčivo není v plazmě stabilní alespoň po dobu 3-5 hodin, není vhodné použít dialýzu, ale naopak ultrafiltrace se jeví jako vhodná alternativa. Jestliže léčivo vykazuje nespecifickou vaznost na povrchy a membrány, je doporučeno použít např. ultracentrifugaci nebo nespecifickou vaznost s co největší přesností určit a zohlednit při výpočtu volné frakce. [55]

Je velmi důležité při měření vaznosti udržovat konstantní pH co nejbližší fyziologické hodnotě 7,4, jelikož velké množství léčiv obsahuje ve své struktuře aminoskupinu s pKa 7-8 a jejich vaznost je tedy na pH velmi závislá. U rozmrazené plazmy se pH může pohybovat i mezi 8-9 v závislosti na jejím stáří a skladovacích podmínkách [42]. Možnost kontroly pH v průběhu experimentu je tedy jedním z důležitých parametrů při výběru metody. Mezi obecně přijímané postupy pro upravení pH plazmy na požadovanou hodnotu patří inkubace v přítomnosti 5-10 % CO₂ nebo zředění plazmy fosfátovým (PBS - *phosphate-buffered saline*) nebo citrátovým pufrům [40; 56].

Před samotným stanovením je doporučováno ponechat léčivo minimálně 30 min inkubovat ve vybrané matrici (plazma, roztok albuminu), aby se mohla ustanovit rovnováha mezi volnou a vázanou frakcí léčiva a získané výsledky odpovídaly realitě [20].

V následujícím textu jsou detailněji charakterizovány vybrané metody pro stanovení vazby léčiv na proteiny.

Rovnovážná dialýza

Standardní metodou pro stanovení vaznosti léčiv se stala dialýza v rovnovážném stavu (ED – *equilibrium dialysis*). Využívá dvě cely oddělené semipermeabilní membránou propouštějící malé molekuly (léčivo), ale zadržující vysokomolekulární látky, tj. proteiny. Do jedné cely je umístěn vzorek plasmy obsahující navázané léčivo, do druhé izotonický pufr. Celé zařízení je inkubováno při 37° C za třepání, až je dosaženo rovnovážné koncentrace volné frakce léčiva v obou celách (obrázek 10). Následně je změřena koncentrace léčiva v obou celách a vypočtena vaznost [1; 41]. Doba, za kterou se ustanoví rovnováha, je závislá mimo jiné na vlastnostech léčiva a membrány, ale běžně se pohybuje v rozsahu 4-6 hodin a lze ji mírně zkrátit třepáním.



Obr. 10 – Schematické znázornění rovnovážné dialýzy (převzato [1])

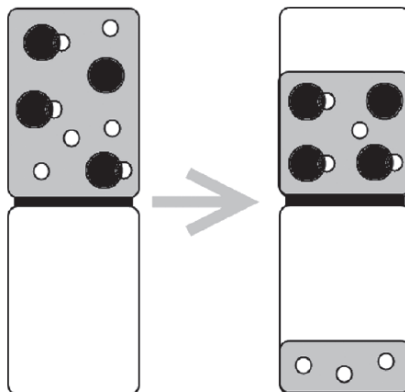
Výhodou je, že měření probíhá v ekvilibriu a poskytuje tedy spolehlivé a přesné výsledky vaznosti. Často se proto používá jako srovnávací metoda. Mezi hlavními nevýhodami jsou zmiňovány dlouhý čas k dosažení rovnováhy, nutnost zjistit v pilotním experimentu, jaký čas je pro dosažení rovnováhy potřeba pro konkrétní léčivo a experimentální podmínky, přestup tekutiny přes membránu způsobený onkotickým tlakem proteinů („*volume shift*“), nespecifická vazba na stěny cely a Donnanův efekt (neschopnost nabitých částic distribuovat se rovnoměrně na obou stranách membrány) [2; 54].

Díky možnosti provedení dialýzy v 96jamkovém formátu lze zvýšit množství měřených vzorků a postup automatizovat [1].

Ultrafiltrace

Ultrafiltrace představuje rychlejší alternativu k dialýze. Tato metoda je také založená na průchodu nevázané frakce léčiva přes membránu. Plazma obsahující léčivo je umístěna do ultrafiltrační kolonky (obrázek 12) a centrifugována při nízkých otáčkách (přibližně 2 000 x g) [2]. Malé molekuly volné frakce léčiva společně s tekutinou procházejí

působením odstředivé síly přes membránu a tvoří ultrafiltrát, zatímco velké molekuly proteinů (včetně navázaného léčiva) zůstávají ve vzorku (obrázek 11). Následně je zjištěna koncentrace léčiva v ultrafiltrátu a spočítána vaznost [1].



Obr. 11 – Schematické znázornění ultrafiltrace (převzato [1])

Aby nedocházelo k narušení rovnováhy mezi volnou a vázanou frakcí v průběhu centrifugace, a tím k ovlivnění vaznosti, neměl by objem ultrafiltrátu překročit 10 % celkového objemu vzorku. Ze stejného důvodu je potřeba zajistit kontrolu pH a teploty během ultrafiltrace. [2]

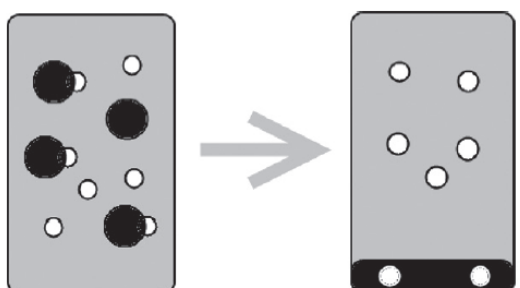
Ultrafiltrace je velmi rozšířenou metodou používanou pro stanovení vaznosti především díky své jednoduchosti a rychlosti. Velkými nevýhodami této metody jsou však riziko nespecifické vazby léčiv na membránu a povrch kolonky, problémy s citlivostí stanovení u vysoce vázaných látek, Donnanův efekt a pronikání proteinů membránou [1].



Obr. 12 - Komerčně dostupné ultrafiltrační kolonky - Centifree (Merck Millipore, převzato [57]).

Ultracentrifugace

Metoda využívá působení velmi vysoké odstředivé síly (přibližně 500 000 x g) na vzorek po dlouhou dobu (10 – 24 hodin) bez použití membrány. Proteiny s navázaným léčivem jsou usazeny na dně zkumavky a je stanovena koncentrace léčiva v supernatantu, což odpovídá jeho volné frakci (obrázek 13) [2]. Tato metoda není často používána, především kvůli vysoké ceně vybavení, nízkému počtu analyzovatelných vzorků a malému objemu supernatantu [1]. Problémem může být i sedimentace léčiva, která se u menších molekul může pohybovat kolem 10 %. Na druhou stranu není metoda spojována s běžnými nežádoucími efekty membránových technik zmíněných výše [54].



Obr. 13 - Schematické znázornění ultracentrifugace (převzato [1])

Afininí chromatografie

Metoda využívá principu kapalinové chromatografie, kdy zkoumaná látka interaguje s vazebným místem proteinu (nejčastěji HSA nebo BSA), který je imobilizován na nosiči a tvoří stacionární fázi.

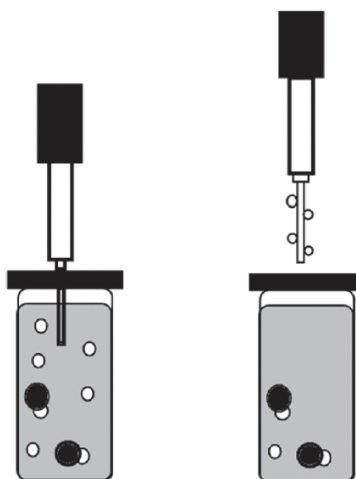
Vaznost na proteiny je pak odvozena z retenčního času sledovaného léčiva. Výhodami jsou kratší časy analýz oproti rovnovážné dialýze a ultrafiltraci, vyšší přesnost a opakovatelnost oproti konvenčním metodám a stabilní a konstantní vazebné chování imobilizovaného proteinu, umožňující provedení velkých sérií studií vaznosti. Dále umožňuje provést enantioselektivní stanovení a rozlišit i velmi malé rozdíly ve vaznosti léčiv [20; 54; 58]. Na druhou stranu je pro tuto metodu kritickým způsob imobilizace proteinu na nosič, protože může ovlivnit výslednou vazebnou schopnost daného proteinu např. denaturací, nevhodnou orientací vazebných míst nebo jejich sterickým bráněním. Prioritou je vybrat takový způsob imobilizace, který umožní chování proteinu podobné jeho chování v roztoku. Stejně tak je třeba přizpůsobit podmínky separace, jelikož nefyziologické podmínky (organické modifikátory, úprava pH) mohou změnit konformaci proteinu a ovlivnit tím vaznost. Důležitý je i výběr samotného nosiče tak, aby

vykazoval co nejnižší chromatografickou aktivitu, která by snížila přesnost stanovení [54; 58].

V praxi je proto tato metoda nejčastěji používána pro velké srovnávací studie vaznosti a určení vaznosti léčiv na specifické proteiny [54].

Mikroextrakce na pevnou fázi

Mikroextrakce na pevnou fázi (SPME) patří mezi alternativní metody pro stanovení vaznosti. Metoda je založená na extrakci analytu malým množstvím sorbentu naneseným na pevné opoře (nejčastěji v podobě vlákna) a využívá proporcionalitu extrahovaného množství k volné koncentraci látky (obrázek 14) [16; 59; 40].



Obr. 14 - Schematické znázornění SPME (převzato [1])

Vzhledem k omezenému množství analytu, které může být na sorbent navázáno, nedochází k narušení rovnováhy mezi volnou a vázanou frakcí ustanovenou ve vzorku, což je jeden ze základních předpokladů pro stanovení reálných hodnot vaznosti na proteiny. Je dokonce doporučováno, aby se hodnoty výtěžnosti pohybovaly jen kolem 1 – 10 % [60; 61; 62; 63].

Výhodou SPME oproti standardním metodám pro stanovení vaznosti (dialýza, ultrafiltrace) je nepřítomnost membrány, což umožňuje použití této metody u látek, které jinak vykazují vysokou nespecifickou vaznost. Dalšími výhodami jsou možnost použití malé objemu vzorku, krátký čas, možnost automatizace a práce ve složitých maticích (včetně plné krve) a minimální maticové efekty [63; 40].

Využití metody naopak může limitovat vazba proteinů ze vzorku na sorbent (označováno jako „fouling“), která může ovlivnit stanovení vaznosti léčiva dvěma opačnými způsoby:

1) zpomalením kinetiky extrakce dojde ke snížení extrahovaného množství a následnému nadhodnocení hodnoty vaznosti (zvláště pokud se pro stanovení používá pre-ekvilibrační část extrakční křivky); 2) extrakce léčiva vázaného na adsorbované proteiny zvýší stanovenou hodnotu volné frakce léčiva. První zmíněný efekt lze omezit použitím delších extrakčních časů, při kterých kinetika extrakce a extrahované množství nejsou tak úzce svázány jako je tomu u velmi krátkých extrakčních časů (obrázek 2) [60]. Adsorbované množství proteinů je možné omezit využitím biokompatibilních sorbentů nebo případně optimalizací SPME postupu [20; 21].

2.5 Analyzované látky

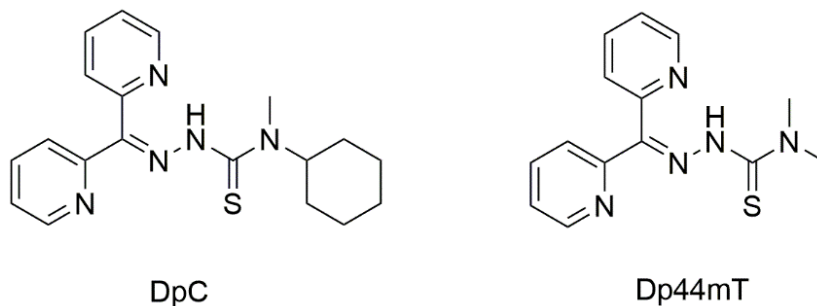
2.5.1 Thiosemikarbazony

Thiosemikarbazony patří mezi významné **chelátory** zkoumané pro svůj **antiproliferativní účinek** jako potenciální protinádorová léčiva. Vazbu iontů kovů (například železa, mědi nebo zinku) umožňuje blízkost síry a dvou dusíků v jejich molekule (obrázek 15). Tyto látky se dostaly do popředí zájmu na základě hypotézy, že nádorové buňky potřebují pro své přežití a replikaci větší množství železa a budou tedy náchylnější k jeho nedostatku [64; 65].

Předpokládá se, že tyto látky vykazují **komplexní mechanismus účinku** zahrnující inhibici ribonukleotid-reduktázy (enzymu důležitého pro *de novo* syntézu deoxyribonukleotidů), tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů, zvýšení tvorby proteinu potlačujícího tvorbu metastáz nebo ovlivnění apoptotických a onkogenních signalizačních drah [66; 65; 67; 64; 68]. Dále se zdá, že díky ovlivnění aktivity P-glykoproteinu na lysozomech jsou schopny překonat jeden z mechanismů vzniku rezistence nádorů vůči léčbě doxorubicinem [69].

Jednou z prvních studovaných látek byl 3-aminopyridin-2-karbaldehydthiosemikarbazon (pod obchodním názvem Triapine[®]), který vykazoval vysokou účinnost *in vitro*. Během klinických studií se bohužel vyskytly vážné nežádoucí účinky včetně methemoglobinémie a hypoxie [70; 71]. Jeho neúspěch podnítil vývoj účinnějších a selektivnějších thiosemikarbazonů, mezi nimiž vynikal především **Dp44mT** (di-2-pyridylketon-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon). Přestože v *in vitro* a klinických studiích vykazoval **vysokou účinnost** proti vícero typům nádorového bujení, jeho využití taktéž limituje **relativně vysoká toxicita** projevující se vznikem methemoglobinémie a srdeční fibrózy [70; 65; 72].

Vůdčí molekulou druhé generace thiosemikarbazonů se stal **di-2-pyridylketon-4-cyklohexyl-4-methyl-3-thiosemikarbazon (DpC)**, který vstoupil v roce 2016 do klinického hodnocení [73]. Přestože se strukturně velmi podobá Dp44mT, vykazuje vyšší účinnost a podstatně méně nežádoucích účinků. Navzdory své podobnosti se látky výrazně liší i svými farmakokinetickými vlastnostmi [74].



Obr. 15 – Zástupci látek ze skupiny thiosemikarbazonů – DpC a Dp44mT

2.5.2 Antracykliny

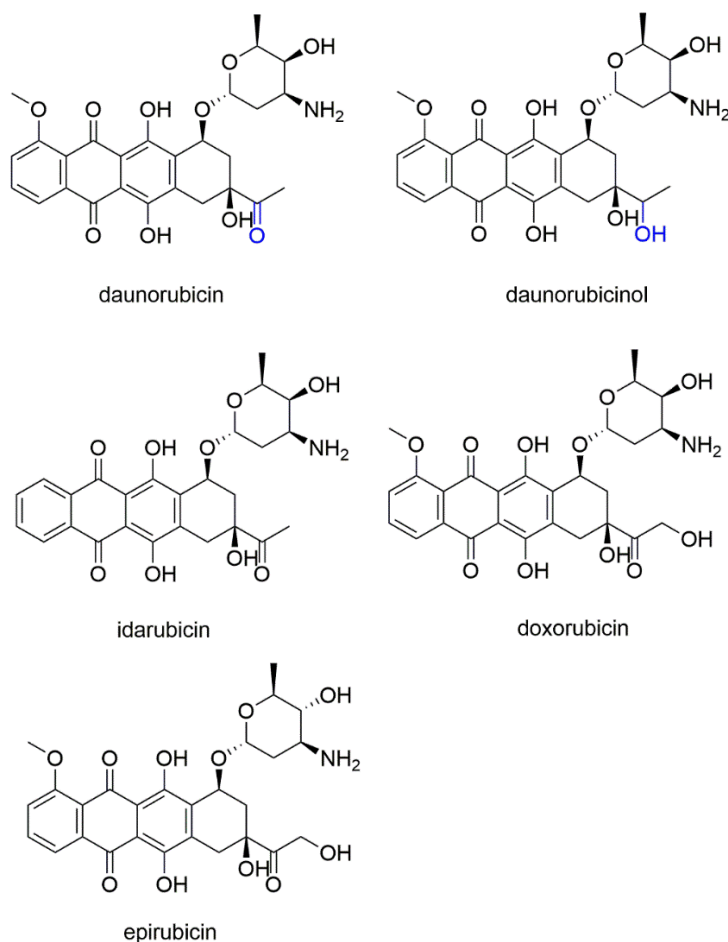
Antracykliny jsou původem **aminoglykosidová antibiotika** izolovaná z rodu *Streptomyces*, která se ale více používají pro svůj **protinádorový účinek** například při léčbě rakoviny prsu a vaječníků, leukémie, lymfomů, karcinomu štítné žlázy nebo žaludku a sarkomu. V České republice se v klinické praxi používají **doxorubicin, epirubicin a idarubicin**, minimálně pak **daunorubicin** (obrázek 16) [75; 76].

Společně s epipodofylotoxiny (etoposid, mitoxantron) patří mezi **topoizomerázové jedy**, jejichž mechanismem účinku je stabilizace vzniklého kovalentního komplexu mezi enzymem topoizomerázou II (TOP II) a DNA, což působí zlomy v DNA a zabraňuje tak její úspěšné replikaci a následnému dělení buňky [75; 77; 78]. Dále u nich byla popsána schopnost interkalace planárního aglykonu do DNA, čímž narušují schopnost jaderné helikázy rozpojit dvoušroubovici DNA na jednotlivá vlákna [79], a schopnost v přítomnosti formaldehydu vytvářet kovalentní adukty s jedním z vláken DNA (byl popsán synergický účinek při kombinaci se sobuzoxanem). [80] Díky přítomnosti chinonu v molekule mohou podstoupit jedno- nebo dvouelektronovou redukcí a napomoci vzniku vysoce reaktivních produktů – radikálů, které poškozují okolní makromolekuly a lipidy v membránách [81]. To vše nakonec vede k apoptóze buňky.

Závažným projevem jejich akutní toxicity limitujícím dávkou je útlum krvetvorby, následovaný nauzeou, zvracením a alopecií. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem je pak **kardiotoxicita** [75; 82]. Právě chronická kardiotoxicita, která úzce souvisí s podanou

kumulativní dávkou a může vést až k rozvoji srdečního selhání, byla předmětem mnoha studií a bylo navrženo několik možných mechanismů jejího vzniku a v souvislosti s tím několik možných strategií její prevence a léčby [83; 84].

Jednou z prvních hypotéz bylo poškození DNA zvýšenou tvorbou reaktivních kyslíkových radikálů (superoxidového a hydroxylového), vznikajících elektronovým přenosem mezi chinonovou skupinou antracyklinu a molekulou kyslíku [85; 86; 83]. V poslední době se za hlavní **mechanismus vzniku kardiotoxicity považuje nekompetitivní inhibice TOP II, přesněji její β -izoformy**, která se na rozdíl od TOP II α (jejíž inhibice je odpovědná za antiproliferativní účinek těchto látek) nalézá v nedělicích se buňkách (včetně kardiomyocytů) [86; 84]. Dalšími zmiňovanými mechanismy jsou narušení homeostázy vápníku, dysregulace degradace proteinů nebo narušení funkce a poškození mitochondrií [86; 83; 84].



Obr. 16 – Struktury klinicky používaných léčiv ze skupiny antracyklinů (daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, a idarubicin) a metabolitu daunorubicinolu

Antracykliny jsou metabolizovány pomocí karbonylreduktázy za vzniku **metabolitů s alkoholovou skupinou na uhlíku C¹³** (doxorubicinol, daunorubicinol – obrázek 16) [87]. Proběhlo několik studií sledujících metabolizaci, ukládání metabolitů ve tkáních a jejich podíl na projevení kardiotoxického účinku, ale jejich závěry nejsou konzistentní. Ukázalo se, že metabolity jsou ukládány v srdeční tkáni a některé studie poukázaly na vyšší potenci doxorubicinolu k poškození srdečního svalu [88; 89]. Na druhou stranu studie publikované pro daunorubicinol, které ale nejsou ve svých výsledcích jednotné, neprokázaly větší vliv metabolitu na toxicitu [90; 89].

2.5.3 Bisdioxopiperaziny

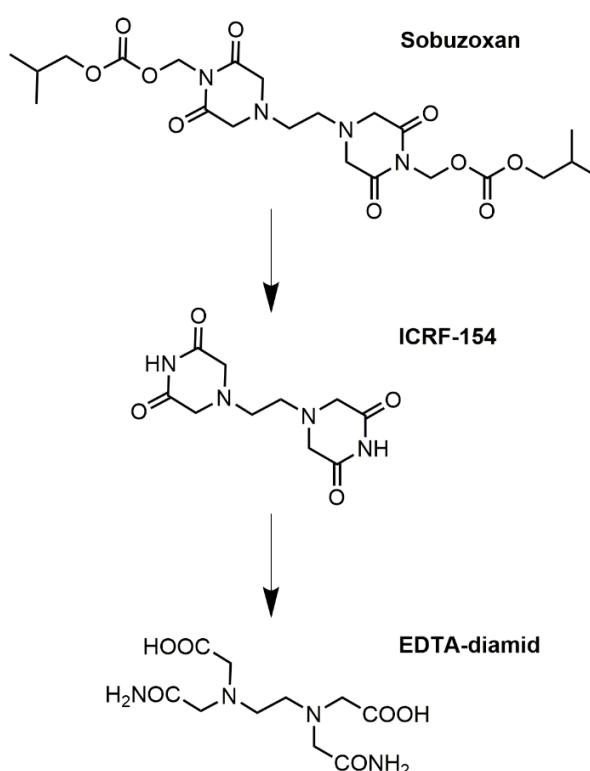
Bisdioxopiperaziny byly nejprve studovány pro svůj **protinádorový potenciál**. Předpokládalo se, že mechanismem jejich účinku je chelatace iontů kovů (především železa) v buňce, jelikož se v organismu metabolizují na chelatující látky strukturně podobné kyselině ethylendiamintetraoctové (EDTA). Až v devadesátých letech bylo objeveno, že jsou schopny inhibovat savčí DNA topoizomerázu II (TOP II), enzym zodpovědný za konformační změny DNA během její replikace [78; 91; 92]. Společně s dalšími látkami (merbaron, suramin) jsou řazeny do skupiny **katalytických inhibitorů TOP II**. Na rozdíl topoizomerázových jedů (např. antracykliny) inhibují vazbu enzymu na DNA, čímž omezují jeho činnost a brání buňce v jejím dělení. Jejich účinek je specifický pro G₂/M fázi buněčného cyklu. V určitých situacích mohou dokonce působit jako antagonisté topoizomerázových jedů [77; 78; 80].

Při následném výzkumu bylo zjištěno, že jeden z nich, dexrazoxan (označovaný jako ICRF-187), má významnější **kardioprotektivní působení** než protinádorový účinek. Byl proto zaveden do klinické praxe jako léčivo chránící před rozvojem chronické kardiotoxicity u pacientů užívajících antracykliny a je zatím jediným klinicky používaným léčivem v této indikaci [93].

Další vývoj bisdioxopiperazinů byl značně omezen jejich nízkou rozpustností vedoucí k špatné absorpci z GIT, a tím k **nízké biologické dostupnosti**. Jedním z řešení tohoto problému byla příprava nových, více **lipofilních proléčiv**, včetně **analogů ICRF-154** (1,1'-ethylendi-3,5-dioxopiperazin, obrázek 17) - bis(N¹-acyloxymethyl)-derivátů. Řada z nich vykazovala protinádorové účinky [94]. Jedním z nich je i proléčivo **sobuzoxan** (bis(N¹-isobutyloxykarbonyloxymethyl-2,6-dioxopiperazin), obrázek 17), které je od roku 1994 registrovaným protinádorovým léčivem v Japonsku například pro

léčbu lymfomů a T-buněčné leukémie dospělých (ATL) [77]. Mezi jeho hlavní nežádoucí účinky patří působení myelosuprese [94; 78].

Proléčivo sobuzoxan je v organismu prakticky okamžitě působením esteráz přeměněno na aktivní formu ICRF-154 za uvolnění formaldehydu a CO₂ [80]. Vzhledem k jeho podobnosti s dexrazoxanem se předpokládá, že ICRF-154 je dále metabolizován na **analog s otevřenými bisdioxopiperazinovými kruhy** - 2,2'-{(ethan-1,2-diyl)bis[(2-amino-2-oxoethyl)imino]}dioctovou kyselinu (**EDTA-diamid**, obrázek 17), ale žádná potvrzující studie nebyla dosud publikována. Zjednodušené schéma předpokládané přeměny je znázorněno na obrázku 17.



Obr. 17 - Zjednodušené schéma předpokládaného rozkladu sobuzoxanu v organismu

2.5.4 Aroylhydrazony

Aroylhydrazony patří mezi **lipofilní chelátory železa** vznikající kondenzací primárního aminu s aldehydem nebo ketonem (Schiffovy báze). Původně byly tyto molekuly, v čele s pyridoxal isonikotinoyl hydrazonem, vyvíjeny pro léčbu přetížení organismu železem [95] a dále byly provedeny rozsáhlé studie jejich antiproliferativního účinku [96; 65; 70]. Až později se ukázalo, že jsou schopny chránit buňky před poškozením různými oxidanty a před antracykliny-způsobenou kardiotoxicitou. [83; 65; 70; 97] Předpokládaným mechanismem jejich protektivního účinku je snížení oxidačního stresu chelatací železa,

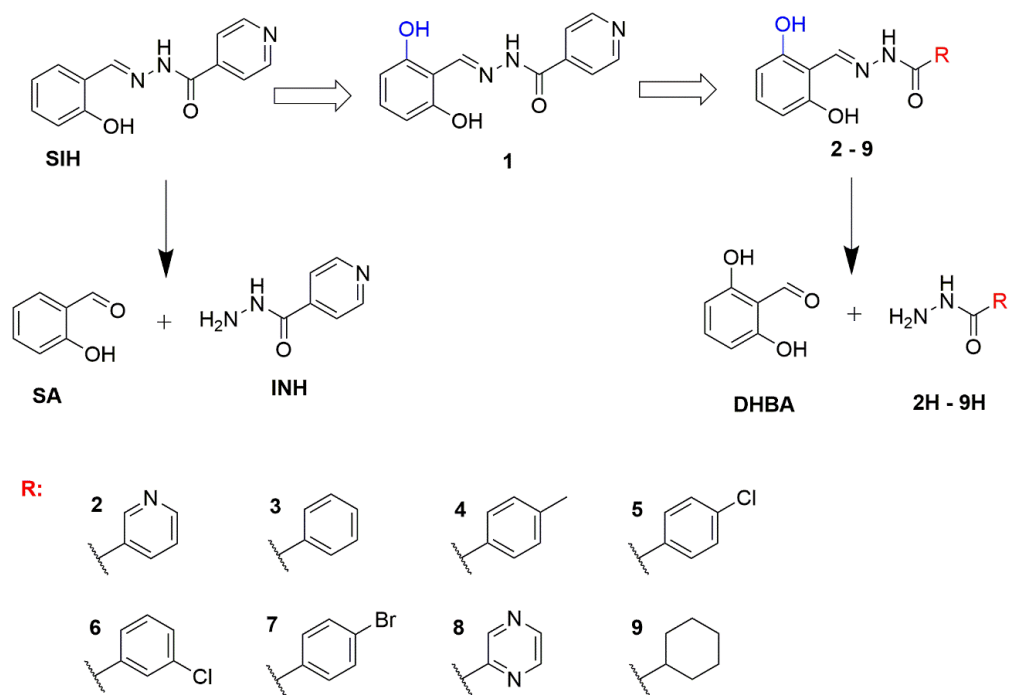
kteřé by se jinak mohlo účastnit Fentonovy reakce a tvorby kyslíkových radikálů poškozujících buňky [98].

Oproti dřívě studovaným chelátorům (deferoxamin, deferipron nebo deferasirox) jsou méně toxické a dobře tolerované [83].

Mezi novější studované látky s vyšší lipofilitou patří **salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH, obrázek 18)**, který vykazoval protektivní působení na srdečních buňky proti oxidačnímu poškození navozenému peroxidem vodíku a katecholaminy [99; 100; 101] a také vůči kardiotoxicitě způsobené daunorubicinem [102]. Limitací této látky je však **krátký biologický poločas** ($t_{1/2} = 17$ min), který je způsoben rychlou hydrolyzou hydrazonové vazby v plazmě [103]. Jedná se o vlastnost celé třídy těchto látek způsobenou spojením izoniazidu s aromatickými aldehydy [104].

Naše skupina se zabývala syntézou a zkoumáním **nových derivátů PIH** a především **SIH**, které by vykazovaly vyšší kardioprotektivní účinnost, nízkou toxicitu a **vyšší stabilitu proti hydrolyze**. Studován byl vliv obměny na uhlíku v těsné blízkosti hydrazonové vazby v kombinaci se substitucí na fenolickém jádře pomocí různých elektronových donorů a akceptorů (hydroxyl, nitroskupina, halogeny) nebo jeho záměna za pyridin [104; 105]. Zaměřili jsme se také na přípravu prolečiv (např. boronylester BSIH) [106]. Dále byl zkoumán vliv umístění a počtu heteroatomů v hydrazidové části a možnost jejího nahrazení větším aromatickým jádrem (bifenyl, naftyl) [107].

V poslední studii jsme se zaměřili na syntézu a hodnocení derivátů SIH, **u kterých byla nahrazena salicylaldehydová skupina skupinou 2,6-dihydroxybenzaldehydovou**, od čehož jsme si slibovali vyšší stabilitu vůči hydrolyze a zlepšení schopnosti chelatace. Studované struktury jsou zobrazené na obrázku 18.



Obr. 18 - Struktury SIH a jeho nově syntetizovaných derivátů (1 - 9) doplněné o předpokládané rozkladné produkty (SA – salicylaldehyd, INH – izoniazid, DHBA – 2,6-dihydroxybenzaldehyd a hydrazidy 2H – 9H)

3 Cíle práce

Tato disertační práce je rozdělena do dvou tematických celků věnovaných bioanalytickému hodnocení potenciálních protinádorových a kardioprotektivních léčiv s využitím kapalinové chromatografie s hmotnostní nebo spektrometrickou detekcí. Vyvinuté metody byly použity pro stanovení vaznosti léčiva na proteiny, studium osudu léčiv při *in vitro* experimentech a porovnání stability nově syntetizovaných derivátů.

Dílčí cíle:

1. Připravit SPME vlákna na nekovovém podkladu vhodná pro extrakci DpC z plazmy
2. Optimalizovat SPME metodu s následnou UHPLC-MS analýzou pro stanovení vaznosti na proteiny u DpC
3. Využít vyvinutou SPME metodu pro *in vitro* stanovení vaznosti DpC na proteiny v potkaní plazmě
4. Optimalizovat podmínky pro UHPLC-MS stanovení daunorubicinu a daunorubicinolu v biologickém materiálu
5. Použít UHPLC-MS metodu pro studium osudu daunorubicinu při inkubaci s donorem NO - molsidominem, respektive jeho aktivní formou SIN-1 *in vitro*
6. Vyvinout a validovat první UHPLC-MS metodu pro současnou analýzu proléčiva sobuzoxanu, jeho aktivní formy ICRF-154 a EDTA-diamidu v biologickém materiálu
7. Použít vyvinutou UHPLC-MS metodu pro analýzu vzorků z *in vitro* experimentů zaměřených na hodnocení stability, aktivace a metabolismu sobuzoxanu a ICRF-154 v buněčném médiu, srdečních buňkách a králičí plazmě
8. Vyvinout a částečně validovat jednoduchou chromatografickou metodu s UV detekcí pro základní hodnocení stability řady nových aroylhydrazonových derivátů SIH v buněčném médiu

4 Experimentální část – komentář k přiloženým publikacím

4.1 Bioanalytické hodnocení protinádorových látek

V první části tohoto celku jsme se zaměřili na vývoj metody pro **stanovení vaznosti na plazmatické bílkoviny** u léčiva ze skupiny protinádorově účinných **thiosemikarbazonů (Příloha 1)**. Experimentální práce s touto skupinou látek probíhala ve spolupráci s prof. Desem R. Richardsonem (Griffith University, Brisbane, Austrálie) a navazovala na již publikované práce, ve kterých byly stanoveny základní farmakokinetické parametry některých látek z této skupiny [74; 67].

DpC byl v době provádění těchto experimentů „vůdčí molekulou“ protinádorových léčiv ze skupiny thiosemikarbazonů a v roce 2016 vstoupil do první fáze klinického hodnocení [73]. V rámci preklinických experimentů byly stanoveny základní farmakokinetické parametry po podání DpC potkanům [74]. Nicméně míra, jakou se DpC váže na plazmatické proteiny, dosud hodnocena nebyla. Proto jsme se v návaznosti na tyto předchozí experimenty zaměřili na možnosti stanovení této důležité charakteristiky.

Z analytického pohledu je DpC velmi problematický analyt, a to hned z několika důvodů. Prvním komplikací je jeho schopnost se **nespecificky vázat na membrány** (včetně PVDF a PTFE filtrů používaných pro filtraci extraktů před analýzou), což znesnadňuje použití standardních membránových technik pro stanovení PPB jako jsou dialýza a ultrafiltrace. Druhým důvodem je jeho schopnost **chelatace iontů**, což je problematické jak při úpravě vzorků před analýzou, tak při vlastní chromatografické analýze, protože vede k výraznému snížení citlivosti a opakovatelnosti stanovení.

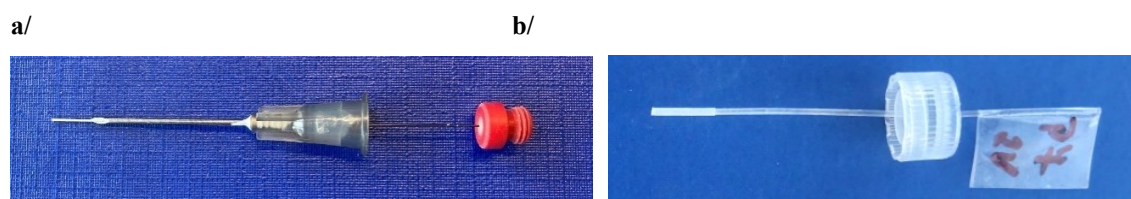
Při pilotních experimentech s ultrafiltrací (kolonky Centifree s membránou z regenerované celulózy, Millipore, USA) jsme zjistili, že nespecifická vazba DpC na membránu významně komplikuje stanovení PPB touto technikou. Při testovaných koncentracích 500 a 1000 ng/ml (blízkých plazmatickým koncentracím dosaženým po *i.v.* podání DpC potkanovi) byla zjištěna nespecifická vaznost látky více než 50 %. Při koncentraci 100 ng/ml (přibližně očekávaná volná frakce v plazmě) se pak blížila 100 %. Tento jev se nám nepodařilo omezit ani použitím surfaktantů (např. benzalkoniumchloridu a 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonátu - CHAPS), jejichž aplikace se běžně v těchto případech doporučuje [108; 109].

Pro stanovení volné frakce DpC v plazmě, jejíž určení je základním předpokladem pro výpočet vaznosti na proteiny, jsme se tedy rozhodli vyzkoušet **mikroextrakci na pevnou fázi (SPME)**. Jedná se o metodu, která nevyužívá pro separaci volné a vázané frakce látky membránu, a tudíž jsme předpokládali, že by mohla být pro tento účel vhodná.

Pro analýzu vzorků po extrakci jsme modifikovali UHPLC-MS/MS metodu pro stanovení DpC a jeho metabolitů v plazmě, která byla již dříve publikována naší skupinou [74]. Kolona a složky mobilní fáze zůstaly stejné, ale gradientová eluce byla vystřídána izokratickou analýzou. Další změnou byla výměna vnitřního standardu - strukturní analog byl nahrazen izotopicky značeným DpC – DpC-*d4*. Všechny tyto změny umožnily zkrácení metody na 2 min, což výrazně urychlilo analýzu vzorků po SPME extrakci.

Komerčně dostupná vlákna pro SPME mají sorbent nanesený na kovový nosič, což není s ohledem na chelatační vlastnosti DpC vhodné. Proto jsme se rozhodli pro přípravu vlastního vlákna, pro které jsme jako nosič použili **nebarvený silikonový vlasce**. Ten poskytl snadnou manipulaci, nízkou cenu a zároveň dostatečnou mechanickou a chemickou odolnost. Jako sorbent byl použit **C18-modifikovaný silikagel** o velikosti částic 50 μm běžně používaný při SPE extrakcích (Discovery DSC-18, Sigma-Aldrich, Německo).

Zdrsněný konec vlasce byl pokryt tenkým filmem **polydimethylsiloxanu (PDMS)**, na který byl následně nanesen C18 sorbent. Vlákno bylo zahřáto na 50 °C, což urychlilo polymerizaci PDMS a zajistilo tak uchycení sorbentu na vlákne. Tímto jednoduchým manuálním postupem jsme připravili vlákna o různých délkách naneseného sorbentu (0,5 a 1 cm) a počtu vrstev (1 - 3). Jako nejvýhodnější se nám jevila kombinace délky 1 cm a **2 vrstev sorbentu**, která zachovala relativně nízkou extrakční výtěžnost a umožňovala manuální přípravu s přijatelnou opakovatelností a homogenním rozmístěním sorbentu. Na následujícím obrázku je pro ilustraci fotografie komerčně dostupného SPME vlákna (SPME LC Probe - Supelco, obrázek 19 a/) a manuálně připraveného v naší laboratoři (obrázek 19 b/).



Obr. 19 - Porovnání komerčně dostupného SPME vlákna (a/) a manuálně připraveného v naší laboratoři (b/)

Optimální doba extrakce DpC na sorbent vlákna a následné desorpce byly vybrány na základě stanovení časových profilů s použitím PBS pufru. Pro určení základních parametrů extrakce a ověření opakovatelnosti přípravy vlákna bylo možné pro urychlení použít čas extrakce 30 min. Avšak při vlastním stanovení vaznosti bylo nutno extrahovat vzorek po dobu **24 h**, abychom pracovali v rovnovážné fázi extrakční křivky. Toto je jeden ze základních předpokladů pro využití postupu a výpočtů pro stanovení volné frakce prezentovaných v literatuře [40]. Porovnáním profilů extrakce (desorpce) v PBS, potkaní plazmě a roztoku BSA jsme vyloučili vliv plazmatických proteinů na kinetiku extrakce (desorpce).

Vzhledem k chelatačním vlastnostem DpC byl při kondicionaci vlákna mezi extrakcemi i jeho oplachu pro odstranění organického rozpouštědla nebo matrice z jeho povrchu využíván roztok K₂EDTA. Optimalizované podmínky, za kterých byla extrakce prováděna, jsou uvedeny v tabulce 1.

Krok	Trvání	Matrice	Objem (ml)	Třepání (rpm)	Teplota (°C)
Kondicionace; Oplach	30 min/10 s	EDTA* (500 µM) / ACN (1:1, v/v); následováno EDTA* (100 µM)	1	800	RT
Extrakce	24 hod	BSA nebo plazma	0,2	0	37
Oplach	10 s	EDTA* (100 µM)	1	800	RT
Desorpce	30 min	ACN s IS	0,1	800	RT

* Vodný roztok EDTA

ACN – acetonitril; RT – laboratorní teplota; BSA – roztok hovězího sérového albuminu; IS – vnitřní standard

Tabulka 1 – Optimalizované podmínky extrakce DpC pro stanovení PPB z roztoku BSA a plazmy

Pro optimalizovaný postup extrakce byla hodnocena **linearita** v rozsahu relevantním pro následné stanovení volné frakce DpC v plazmě. **Opakovatelnost** extrakce byla ověřena pro oba extrakční časy (30 min i 24 hod).

Přestože není stanoven přesný limit pro maximální výtěžnost u SPME metody používané pro stanovení vaznosti na proteiny, většina autorů se shodne na tom, že **extrahované množství má být co nejnižší**, aby byla při extrakci co nejméně ovlivněna rovnováha mezi vázanou a nevázanou frakcí léčiva. Nejčastěji jsou jako vhodné navrhovány hodnoty výtěžnosti do 10 % [61; 110; 62]. V případě, že je extrahováno vyšší množství analytu,

je doporučováno extrakci provádět v rovnovážné části extrakční křivky za použití delších extrakčních časů [60]. I přes to je potřeba připustit, že určitou limitací využití námi připravených vláken pro stanovení PPB u DpC je výtěžnost 16,5 %. Pro dosažení nižší výtěžnosti by bylo vhodné vyzkoušet přípravu vláken s menším objemem sorbentu. V tomto případě by však byla manuální příprava vlákna velmi složitá, protože by bylo problematické rovnoměrně nanést souvislou vrstvu sorbentu. Manuální příprava by tak musela být pravděpodobně nahrazena automatizovaným způsobem [111].

Jednou z hlavních limitací použití SPME pro stanovení PPB je **schopnost proteinů z matrice ulpívat na sorbentu** (tzv. „*fouling*“) [20]. Pro kvantifikaci proteinu navázaného na sorbent po extrakci z roztoku BSA (600 μ M) a z plazmy jsme využili bicinchoninovou metodu (BCA metodu). Zjistili jsme, že při použití našeho optimalizovaného postupu extrakce je na vlákno navázáno 7-10 pmol proteinů. Nicméně vzhledem k tomu, že obsazenost vazebných míst na proteinu bývá nižší než 10 % (obvykle dokonce nižší než 0,1 %) [20], výsledný vliv na stanovení vaznosti by se v našem případě pohyboval maximálně okolo 1 %. Kromě toho jsme na rozdíl od některých jiných výzkumných skupin [20; 112] během našich experimentů na vláknech nepozorovali žádnou viditelnou vrstvu proteinů ani po opakované expozici trvající 24 hod.

Po kompletní optimalizaci postupu SPME extrakce jsme využili námi připravená vlákna pro vlastní experiment. Vaznost DpC na plazmatické proteiny byla stanovena *in vitro* ve 2 koncentracích (1 000 ng/ml a 500 ng/ml), které se úzce váží k farmakokinetice DpC po podání potkanům (2 mg/kg, *i.v.*) [74]. Pro výpočet vaznosti jsme využili metodiku popsanou Musteatou a Pawliszynem [40]. Zjistili jsme, že se **DpC váže poměrně vysokou měrou, jelikož hodnoty vaznosti byly v rozmezí 88 -90 %**. I když nebyla vaznost DpC dosud stanovena a není tedy možné přímo porovnat námi zjištěné hodnoty s referenčním stanovením, vysoká vaznost na plazmatické proteiny byla zjištěna také u strukturně podobného thiosemikarbazonu (Dp44mT) [67].

V další části této sekce experimentální práce jsme se zabývali **UHPLC-MS/MS analýzou antracyklinového cytostatika daunorubicinu** s cílem sledovat jeho osud při *in vitro* inkubacích. Tato práce byla součástí komplexní studie, zaměřené na studium možností kardioprotektivního působení donorů oxidu dusnatého (NO) na modelu

chronické antracyklinové kardiotoxicity (**Příloha 2**). Studie byla provedená ve spolupráci s pracovníky Ústavu farmakologie (LF UK, doc. Štěrbá) a pracovní skupiny prof. Šimůnka (FaF UK). Hlavním cílem byla snaha objasnit mechanismus potenciálního **kardioprotektivního působení molsidominu**, respektive jeho aktivního metabolitu morfolinosydnoniminu SIN-1.

Molsidomin je derivát sydnoniminu, který uvolněním NO v hladké svalovinné stěně cév způsobí její relaxaci vedoucí k vasodilataci. Jaterními esterázami je přeměněn na aktivní metabolit SIN-1, který je schopen NO uvolnit přímo pomocí spontánní chemické degradace, čímž se liší od ostatních NO-donorů, které k uvolnění NO potřebují enzymy [75; 113; 114; 115].

In vitro experimenty byly zaměřené na studium protektivního potenciálu molsidominu/SIN-1 na modelu chronické antracyklinové toxicity na buněčné linii kardiomyoblastů (H9c2) a izolovaných potkaních primárních neonatálních kardiomyocytech (NVCM - *neonatal ventricular rat cardiomyocytes*). V průběhu těchto experimentů však bylo odhaleno poměrně překvapivé zjištění, že **při použití vyšších koncentrací SIN-1 ($\geq 100 \mu\text{M}$) docházelo ke ztrátě cytotoxicity antracyklinů při inkubaci se srdečními i nádorovými buňkami**. Proto bylo úkolem naší skupiny vyvinout analytickou metodu, která by umožnila zjistit osud DAU během těchto *in vitro* experimentů.

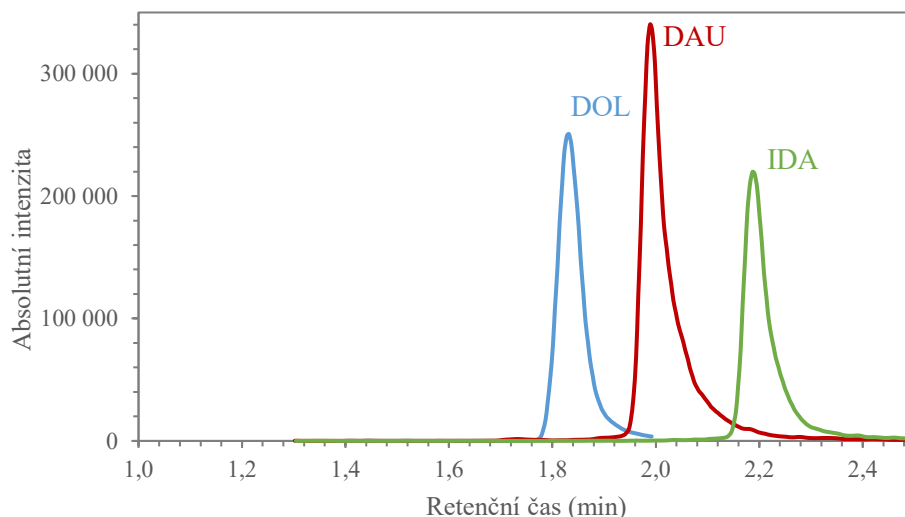
Zaměřili jsme se na vývoj metody pro současné stanovení DAU a jeho metabolitu daunorubicinolu (DOL), který bývá v některých studiích spojován právě s rozvojem antracykliny navozené kardiotoxicity [116; 90]. Stanovení koncentrace molsidominu ani jeho aktivního metabolitu (SIN-1) předmětem vyvíjené analytické metody nebylo.

Při vývoji metody jsme mohli vycházet z řady již dříve publikovaných metod pro stanovení antracyklinů a jejich metabolitů [117; 118; 119; 120; 121; 122; 123] a přizpůsobit poznatky našim podmínkám a vybavení. Autoři publikovaných prací používají nejrůznější reverzní stacionární fáze. Velmi široké je i spektrum použitých detekčních technik od běžněji používaných (hmotnostní spektrometr, fluorescenční detektor) až po využití kombinace fotosenzitivní reakce a chemiluminiscenční detekce. Metody se liší také použitými extrakčními technikami (např. precipitace, extrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce na pevnou fázi a jejich kombinace).

Vzhledem k tomu, že bylo potřeba připravit analytickou metodu pro analýzu vzorků v krátkém čase, byl proveden pouze rychlý screening různých chromatografických podmínek na základě publikovaných metod. Optimální separace bylo dosaženo na koloně Kinetex C18 100A (100×2,1 mm, 1,7 μm, Phenomenex, USA) za použití 0,02% kyseliny mravenčí (A) a směsi acetonitrilu a 0,2% kyseliny mravenčí (9:1, v/v) (B) jako mobilní fáze. S využitím gradientové eluce (30 -70 % B) byla vyvinuta 2,5minutová metoda, s jejíž pomocí bylo možné analyzovat vzorky srdečních buněk (H9c2) a buněčného média používaného při inkubacích (DMEM). Analýza vzorků probíhala pomocí UHPLC s hmotnostní detekcí (trojitý kvadrupól – Shimadzu, Japonsko) za použití ionizace elektrosprejem v pozitivním módu. Využití SRM módu nám poskytlo dostatečnou selektivitu a citlivost pro stanovení. Pro pilotní stanovení koncentrací DAU a DOL v buněčném médiu a uvnitř srdečních buněk nebyl při analýze využit vnitřní standard. V návaznosti na tato stanovení byla metoda dále modifikována pro analýzu obou látek v plazmě a zde byl jako vnitřní standard použit idarubicin (IDA). Ukázkový chromatogram je uveden na obrázku 20.

Při výběru úpravy vzorků před analýzou jsme na základě plánovaného použití upřednostnili především rychlost. Pro úpravu vzorků buněčného média a pufrů jsme zvolili jednoduché zředění methanolem v poměru 1:9. Naředěné vzorky byly ihned analyzovány. Pro zjištění koncentrace DAU a DOL uvnitř buněk byly vzorky krátce sonifikovány v ultrazvukové lázni v přítomnosti methanolu (přidáno 300 μl na vzorek), centrifugovány a oddělený supernatant byl před analýzou ještě zfiltrován. Odebraný vzorek králičí plazmy byl precipitován ledovým methanolem (poměr 1:3), centrifugován a oddělený supernatant byl před analýzou zfiltrován.

Před použitím byla metoda částečně validována dle směrnice amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léků (FDA – *Food and Drug Administration*) [124] z hlediska ověření linearity (0,05 – 1,5 μM), přesnosti a preciznosti. Nebyl pozorován významný vliv složek matrice na signál zkoumaných látek.



Obr. 20 - Ukázkový chromatogram analýzy DAU (červená), DOL (modrá) a vnitřního standardu IDA (zelená) v plazmě (standard o koncentraci 0,6 μM)

Dále bylo ověřeno, že pro analýzu vzorků z dalších relevantních matic – plazmy a PBS a ADS pufrů není potřeba žádná úprava separačních podmínek. Takto připravená metoda byla použita pro analýzu vzorků z *in vitro* experimentů.

Srdeční buňky byly inkubovány s DAU v klinicky relevantní koncentraci (1,2 μM) za přítomnosti SIN-1 (100 μM) a bez něj. Na začátku experimentu, po 3 hodinách a na konci byly zjišťovány koncentrace DAU a jeho metabolitu DOL uvnitř buněk a v buněčném médiu (DMEM).

Následně byl pro srovnání proveden experiment za stejných podmínek, jen v širším rozmezí koncentrací SIN-1 v buněčném médiu (DMEM) bez přítomnosti H9c2 buněk a v PBS a ADS pufru. Výsledky byly porovnány se současně zjištěnou stabilitou DAU v králičí plazmě *in vitro*.

Po inkubaci DAU v samotném buněčném médiu (bez H9c2 buněk) byl pozorován pouze nepatrný pokles koncentrace DAU, který byl srovnatelný s rozkladem pozorovaným po přidání SIN-1 v nízkých koncentracích (0,001-0,1 μM). Naopak při použití 100 μM koncentrace SIN-1 došlo k rychlému poklesu koncentrací DAU. V přítomnosti H9c2 buněk docházelo ke zrychlení rozkladu DAU v médiu (na 50 % za 24 hodin) v porovnání s médiem bez buněk, což bylo doprovázeno nárůstem množství metabolitu DOL. Pokles koncentrací DAU v médiu (v přítomnosti H9c2) byl však dále významně urychlen přidávkou 100 μM SIN-1 (pokles až o 99 % během několika hodin). Překvapivě v tomto případě nebyl v médiu detekován metabolit DOL, což naznačuje, že úbytek DAU

v přítomnosti SIN-1 není způsoben jeho zvýšenou metabolickou přeměnou. Uvnitř H9c2 buněk byly v přítomnosti 100 μ M SIN-1 stanoveny podstatně nižší intracelulární koncentrace DAU i DOL v porovnání se situací bez této látky.

Výsledky našich analýz tedy odhalily, že **SIN-1 ve vyšších koncentracích urychluje rozklad DAU** a tento jev s největší pravděpodobností stojí za neočekávaně nízkou cytotoxicitou antracyklinu při inkubacích srdečních i nádorových buněk s vyššími koncentracemi SIN-1. Tento jev nebyl do této chvíle v literatuře popsán. Současně ale nebyl pozorován vznik metabolitu daunorubicinolu, jako tomu bylo v experimentu za nepřítomnosti SIN-1. Na základě porovnání profilu koncentrací DAU po inkubaci v DMEM médiu a pufrch o stejném pH (ADS, PBS) jsme došli k závěru, že pro katalýzu „rozkladu“ DAU **je nutná přítomnost některé z komponent buněčného média**. V jejím přesném určení jsme už dále nepokračovali. Při inkubacích DAU v plazmě nebyl pozorován výrazný pokles DAU ani v přítomnosti SIN-1, což naznačuje, že by k němu nemělo docházet ani v systémové cirkulaci při *in vivo* experimentu, který probíhal u králíka.

V tomto tematickém celku jsme se zabývali UHPLC-MS/MS analýzou 2 různých protinádorových látek v různém biologickém materiálu. V obou případech jsme přispěli k získání nových informací důležitých pro jejich další výzkum.

Připravili jsme nové vlákno pro SPME extrakci thiosemikarbazonu DpC a získali první data o vazbě tohoto nově vyvíjeného léčiva na plazmatické proteiny. Dále jsme použili moderní analytickou metodu pro objasnění osudu antracyklinu DAU při *in vitro* experimentech, což významně přispělo ke studiu mechanismu možného cytoprotektivního působení molsidominu na modelu chronické antracyklinové toxicity.

4.2 Bioanalytické hodnocení nových látek s kardioprotektivním potenciálem

Sobuzoxan (MST-16) patří mezi protinádorová léčiva klinicky používaná k léčbě hematologických malignit [77; 125]. Jde o proléčivo, které bylo připraveno pro zlepšení absorpce bisdioxopiperazinu **ICRF-154** z GIT po perorálním podání a zvýšení jeho biologické dostupnosti. Svým mechanismem účinku se řadí mezi **katalytické inhibitory TOP II**. Sobuzoxan je v organismu metabolizován hydrolyzou esterové vazby na hydroxymethyl-derivát ICRF-154, z něhož vzniká za uvolnění formaldehydu aktivní forma ICRF-154 [80; 94]. Na základě strukturní podobnosti s dexrazoxanem lze předpokládat, že ICRF-154 následně podléhá hydrolyze, při níž dochází k otevření obou cyklů a k tvorbě chelatujícího metabolitu podobného EDTA, označovaného jako EDTA-diamid. [126]

Vzhledem k **strukturní podobnosti ICRF-154 a dexrazoxanu** se tato látka a její proléčivo jeví jako perspektivní pro studium potenciálního **protektivního účinku vůči chronické antracyklinové kardiotoxicitě**. Důležitou součástí hodnocení jejich protektivního působení je získání informací o aktivaci proléčiva a jeho dalším metabolismu za relevantních podmínek pro toto studium.

Přestože je sobuzoxan registrovaným léčivem v Japonsku [78], v dostupné literatuře nebyla popsána žádná moderní analytická metoda, která by umožnila jej hodnotit společně s ICRF-154 a EDTA-diamidem v biologickém materiálu, což významně komplikuje jeho další výzkum. Jedinou do té doby publikovanou metodou byla HPLC-UV analýza samotného ICRF-154 v plazmě po podání sobuzoxanu myším [94].

Cílem naší práce bylo vyvinout a validovat první UHPLC-MS/MS metodu pro současnou analýzu proléčiva (sobuzoxan), aktivní formy (ICRF-154) a metabolitu (EDTA-diamid) v různých biologických materiálech (buněčné médium - DMEM, pufr, srdeční buňky - NVCM a plazma). Optimalizovaná metoda měla následně nalézt využití při ***in vitro* studii bioaktivace/metabolizmu sobuzoxanu** v těchto maticích v podmínkách relevantních pro studium kardioprotektivního působení (**Příloha 3**).

Jednou z prvních překážek vývoje společné chromatografické metody pro všechny 3 látky je jejich **velmi odlišná lipofilita**, od lipofilního proléčiva až po velmi polární otevřený metabolit, což při využití tradičních C18 sorbentů vyžaduje velmi dlouhé analýzy. Při vývoji metody jsme mohli vycházet z dosavadních zkušeností naší skupiny

s analýzou bisdioxopiperazinových derivátů (dexrazoxan, JR-311) a jejich otevřených metabolitů (ADR-925, JR-H2) [127; 128; 129]. V těchto případech se nám sice podařilo vyvinout metody vhodné pro analýzu vzorků z biologických matric, ale doba analýzy dosahovala 20-30 min, a to i bez přítomnosti lipofilního proléčiva ve vzorcích.

Obzvláště obtížným analytem se ukázal být EDTA-diamid, který je jen málo zadržován na reverzní stacionární fázi, chelatuje stopová množství iontů (zejména železa) v chromatografickém systému a v přítomnosti i malého množství kyseliny mravenčí v mobilní fázi dochází k významné supresi signálu MS detektoru. Tyto vlastnosti pak negativně ovlivňují tvar píku, opakovatelnost a citlivost analýzy.

Přestože se nám dříve osvědčilo využití HILIC pro zvýšení retence polárních analytů [129], v případě, kdy potřebujeme současně analyzovat i lipofilní proléčivo, není tento přístup použitelný.

Pro testování jsme si nakonec zvolili stacionární fázi na bázi grafitického uhlíku (Hypercarb) a reverzní fáze upravené tak, aby interagovaly i s polárními analyty (Synergi Polar, Zorbax SB-Aq). Při použití stacionární fáze na bázi grafitického uhlíku se sice zvýšila retence EDTA-diamidu, ale současně byl silně zadržován i sobuzoxan, a to i při využití gradientové eluce a vysokého podílu organických rozpouštědel v mobilní fázi. Nakonec byla vybrána kolona Zorbax SB-Aq, jež poskytovala mírně lepší tvaru píku pro sobuzoxan a byla komerčně dostupná i s částicemi o velikosti $< 2 \mu\text{m}$, což nám umožnilo využít všech předností UHPLC analýzy.

Se **schopností chelatace** u analyzovaných látek se naše skupina potýkala již dříve a řešila je různými přístupy [74; 128; 130]. V tomto případě byl chromatografický systém promyt směsí 2mM EDTA a acetonitrilu v poměru 90:10 (v:v) před první analýzou. Promytí kolony EDTA bylo nutné opakovat po větším množství provedených analýz nebo při delší přestávce v měření.

Pro zvýšení citlivosti LC-MS stanovení již bylo v literatuře popsáno násobné použití jediného SRM přechodu pro kvantifikaci [131; 132]. Využívá se předpokladu, že odezva pro analyt je při opakovaném měření konstantní, ale šum je náhodný. Součet opakovaného SRM přechodu tedy zvýší odezvu pro analyt, zatímco signál šumu se nezvýší [133]. Tento přístup se osvědčil i v naší práci, kdy jsme zaznamenali při použití tohoto postupu zvýšení citlivosti pro analyzované látky (cca 2x).

Vzhledem k rozdílné polaritě analytů a nedostupnosti izotopicky značených vnitřních standardů byly vybrány 3 vnitřní standardy, které byly strukturně podobné jednotlivým analytům.

Vzhledem k tomu, že se dá předpokládat, že se sobuzoxan bude v biologických matricích rychle rozkládat, upřednostnili jsme **rychlou úpravu** vzorku před analýzou. Pro buněčné médium a pufr jsme zvolili naředění vzorku směsí methanol : voda (20:80, v/v), pro analýzu sobuzoxanu byl vzorek ještě okyselen kyselinou mravenčí pro zlepšení stability proléčiva. V případě vzorků srdečních buněk a plazmy byla použita precipitace proteinů ledovým methanolem.

Optimalizovaná metoda byla následně validována dle kritérií Evropské lékové agentury (EMA) [134]. Byla posuzována selektivita, linearita, přesnost, preciznost, matricové efekty pro jednotlivé analyty a post-preparativní stabilita vzorků při uchovávání v autosampleru (15 °C).

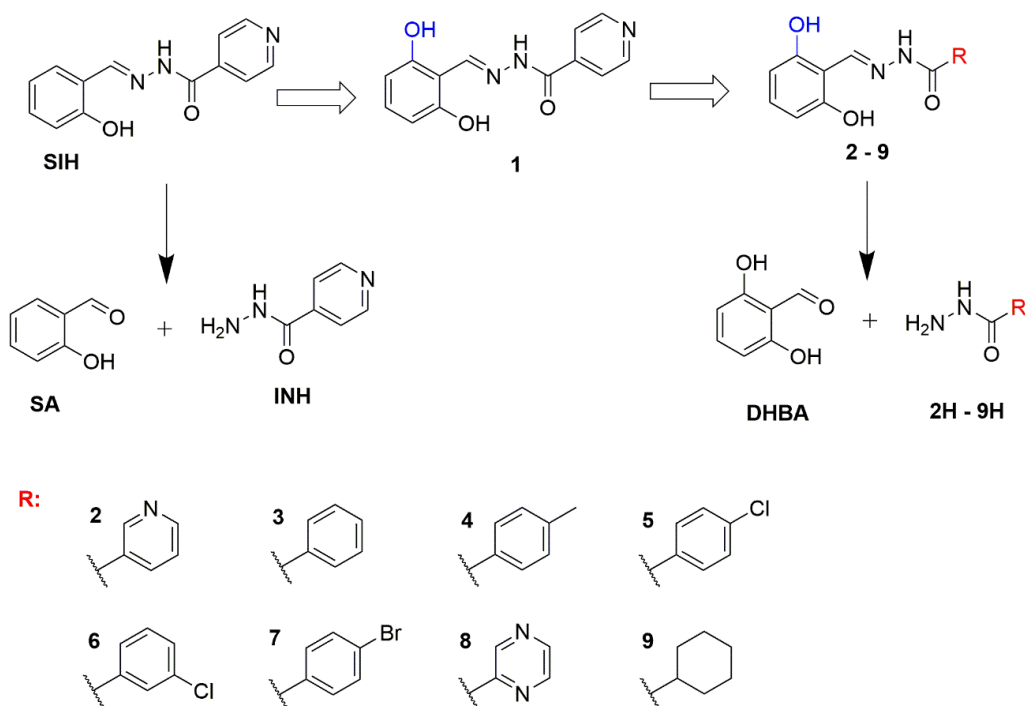
Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení koncentrací analytů ve vzorcích z *in vitro* experimentů zaměřených na studium chemické stability, aktivace a metabolismu sobuzoxanu a ICRF-154 a dále pro studium penetrace sobuzoxanu do NVCM buněk a jeho intracelulární aktivace a metabolismu.

Analýzou vzorků jsme zjistili že: 1/ při inkubaci sobuzoxanu v **DMEM a pufru dochází k pozvolnému rozkladu sobuzoxanu** za vzniku malého množství EDTA-diamidu; 2/ aktivace sobuzoxanu není urychlována složkami média; 3/ **sobuzoxan rychle proniká do srdečních buněk a je zde aktivován na ICRF-154**, a ten dále na EDTA-diamid; 4/ srdeční buňky neurychlují aktivaci sobuzoxanu v DMEM; jde tedy spíše o chemický rozklad než metabolismus; 5/ **v plazmě dochází k velmi rychlé aktivaci a následné přeměně na EDTA-diamid.**

Zjistili jsme, že stanovené množství ICRF-154 a EDTA-diamidu (především při inkubacích sobuzoxanu v DMEM a pufru a v plazmě v prvních minutách experimentu) není ekvimolárně proporcionální k úbytku proléčiva. Tento jev by bylo možné vysvětlit přítomností dalších rozkladných produktů, analogicky jako je tomu u dexrazoxanu. Žádný z nich se nám ale nepodařilo použitou metodou detekovat. Dalším možným vysvětlením by mohla být nízká rozpustnost vzniklého ICRF-154 zejména ve vodných roztocích.

Vedle analogů dexrazoxanu se naše skupina zabývá také studiem kardioprotektivního účinku řady dalších strukturně odlišných látek, včetně **aroylhydrazonů**. Jednou ze starších studovaných látek byl salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (**SIH**), jehož kardioprotektivní působení bylo prokázáno v několika *in vitro* studiích s nejrůznějšími pro-oxidativními látkami [135; 100; 136] a v *in vitro* a *in vivo* experimentech na modelu chronické antracykliny-indukované kardiotoxicity [102]. Nevýhodou limitující jeho další vývoj je však velmi krátký biologický poločas, který je způsoben rychlou hydrolyzou hydrazonové vazby v biologickém materiálu [103]. Již v minulosti byly cílenou obměnou struktury připraveny různé série derivátů a byla testována jejich cytoprotektivní i antiproliferativní aktivita a také stabilita v plasmě *in vitro* [103; 106; 104; 107; 105].

V návaznosti na předchozí výzkum jsme se v naší další práci zaměřili na skupinu strukturních **derivátů SIH**, u kterých byla nahrazena salicylaldehydová skupina skupinou **2,6-dihydroxybenzaldehydovou (Příloha 4)**. Předpokládali jsme, že by deriváty mohly díky této strukturní obměně vykazovat vyšší stabilitu vůči hydrolyze. Chemická struktura derivátů je uvedena na obrázku 21.



Obr. 21 - Struktury SIH a jeho nově syntetizovaných derivátů (1 - 9) doplněné o předpokládané rozkladné produkty (SA – salicylaldehyd, INH – izoniazid, DHBA – 2,6-dihydroxybenzaldehyd a hydrazidy 2H – 9H)

Tato práce byla součástí studie, která proběhla v rámci spolupráce mezi skupinami doc. Roha (Katedra organické a bioorganické chemie) a prof. Šimůnka (Katedra biochemických věd) v rámci které byla popsána syntéza, byly charakterizovány nové

deriváty SIH a byly studovány jejich vybrané biologické vlastnosti. Úkolem naší skupiny bylo **vyvinout jednoduchou chromatografickou metodu s UV detekcí vhodnou pro porovnání stability studovaných látek během experimentu napodobujícího podmínky při inkubaci s kardiomyocyty *in vitro*.**

Cílem bylo dosáhnout co nejjednodušších a pokud možno co jen nejvíce univerzálních podmínek, za kterých by bylo možno separovat všechny zkoumané látky (SIH, deriváty 1 – 9) od složek matrice a jejich předpokládaných rozkladných produktů (SA, DHBA, INH a hydrazidů 2H až 9H, obrázek 21). Takové podmínky by pak umožnili rychlé testování stability všech uvedených derivátů SIH bez nutnosti delšího ustalování mobilní fáze mezi analýzami jednotlivých vzorků.

Vývoj metody vycházel z předchozích zkušeností naší skupiny s analýzou SIH a jeho derivátů [104; 103; 105; 107]. Pro výslednou analýzu byla vybrána kolona Ascentis C18 (100 x 3 mm, 3 μ m, Supelco) v kombinaci s mobilní fází tvořenou smísením složky A (směs 5mM dihydrogenfosforečnanu sodného s 1mM vodným roztokem EDTA) a složky B (methanol) v různých poměrech (v/v). Postačovalo využití izokratické eluce. Výsledná doba analýzy se pohybovala mezi 6 – 10,5 minutami.

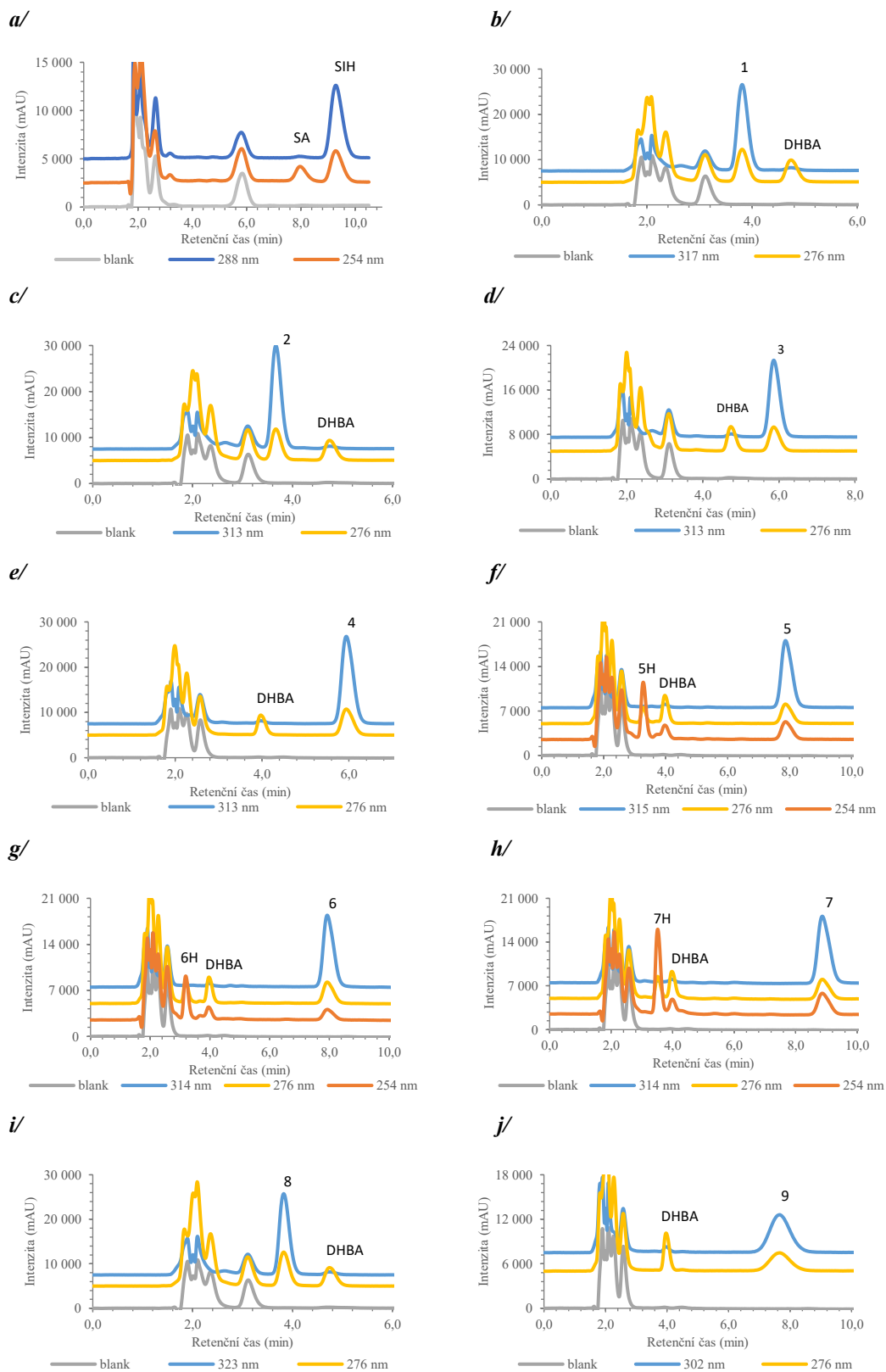
Výsledkem byly 3 metody s rozdílnou koncentrací methanolu v mobilní fázi – 50 % pro analýzu SIH, SA a DHBA, 60 % pro nesubstituované deriváty (1, 2, 3 a 8) a 65 % pro monosubstituované deriváty (4, 5, 6, 7) a cyklohexylderivát (9). Pro detekci bylo využito DAD detektoru a během analýzy bylo proměřeno celé spektrum v rozsahu 190 – 360 nm. Při následném vyhodnocení byly extrahovány chromatogramy při vlnové délce maxima jednotlivých analyzovaných látek, a také při vlnové délce 254 nm. Pro kvantitativní stanovení byla pro každou látku použita odezva při vlnové délce maxima. Optimalizované podmínky jsou uvedené v tabulce 2 a vzorové chromatogramy na obrázku 22.

<i>Látka</i>	<i>obsah MeOH v MF (%)</i>	<i>RT (min)</i>	<i>λ_{max} (nm)</i>
<i>SIH</i>	50	9,4	288
<i>DHBA</i>	50	7,4	376
<i>1</i>	60	3,8	317
<i>2</i>	60	3,7	313
<i>3</i>	60	5,9	313
<i>4</i>	65	6,0	313
<i>5</i>	65	7,9	315
<i>6</i>	65	8,0	314
<i>7</i>	65	8,9	314
<i>8</i>	60	3,8	323
<i>9</i>	65	7,7	302

MF – mobilní fáze; RT – retenční čas; λ_{max} – vlnová délka maxima absorpce

Tabulka 2 Optimalizované podmínky pro analýzu SIH, DHBA a zkoumaných derivátů 1-9

Vzhledem k potřebě velmi rychlého zpracování odebraných vzorků byla k úpravě vzorků buněčného média (DMEM) s přidaným proteinem (BSA; 4,7 mg/ml) použita precipitace ledovým methanolem (v poměru 1:3, v/v). Pro úpravu samotného DMEM bez přidaného proteinu (používaného jako kontrola) bylo využito jednoduchého ředění (v poměru 1:1, v/v) stejným rozpouštědlem. Vzorky byly po odebrání a úpravě ihned analyzovány. Přestože byla metoda primárně vyvíjena za účelem základního zhodnocení stability zkoumaných látek pouze na základě porovnání úbytku jejich koncentrace, rozhodli jsme se současně sledovat, jestli vznikne odpovídající množství předpokládaných rozkladných produktů (obrázek 21) na základě stanovení vzniklého SA (pro SIH) nebo DHBA (pro deriváty 1-9). Isoniazid a rozkladné produkty 2H až 9H byly povětšinou eluovány v blízkosti mrtvého času kolony a balastů matrice, a proto nebylo jejich stanovení do hodnocení zahrnuto.



Obr. 22 - Chromatogramy analýz SIH (a/) a zkoumaných derivátů 1-9 (b/ až j/) ve vzorcích buněčného média (koncentrace 50 μ M); chromatogram blanku zobrazen při 254 nm

Vyvinuté metody byly částečně validovány dle kritérií FDA [124] z hlediska linearity (v rozsahu 10 – 100 μM), přesnosti a preciznosti. Selektivita separace byla ověřena porovnáním se záznamem blanku matrice.

Metody byly následně použity pro analýzu vzorků buněčného média s i bez přidavku BSA, ve kterém byly inkubovány jednotlivé aroylhydrazony. Inkubace probíhaly za identických podmínek, jaké byly používány pro *in vitro* studium kardioprotektivního působení derivátů SIH.

Ukázalo se, že nově připravené deriváty SIH je možno rozdělit do několika skupin na základě podobné stability v buněčném médiu. Látky 1 a 2 (strukturně nejbližší SIH) vykazovaly podobnou stabilitu v buněčném médiu jako předlohový SIH (během 3 hodin klesla jejich koncentrace na 50 % původní hodnoty). Naopak **nesubstituované a monosubstituované benzohydrasonové deriváty (3 – 7) a pyrazinový (8) a cyklohexylový (9) derivát byly v porovnání se SIH stabilnější** (pokles koncentrace na 50 % byl pozorován po cca 12 -16 hodinách). Překvapivě se tak ukázalo, že **substituce další hydroxylovou skupinou v poloze 6 nezvyšuje významně stabilitu hydrasonové vazby**. Naopak významnější vliv na stabilitu bude mít pravděpodobně **vyšší lipofilita látek**.

Monosubstituované deriváty (4 – 7) navíc vykazovaly pouze minimální úbytek koncentrace při inkubaci v samotném buněčném médiu bez BSA a jejich chování se tedy v médiu s proteinem a bez něj liší. U ostatních látek si tyto profily byly velice blízké. Hodnocení cytoprotektivní účinnosti na buněčné linii H9c2 ukázalo, že derivát se substitucí chlorem v *para*-poloze (5, interně označovaný jako JK-31), patřící mezi stabilnější deriváty, vykazoval nejvyšší účinnost v ochraně srdečních buněk před oxidativním stresem způsobeným různými pro-oxidanty. Z této skupiny se tedy jedná o nejnadějnější látku, která svou schopností chelatace, cytoprotektivním působením a stabilitou významně předčila SIH.

V rámci studia kardioprotektivního potenciálu vybraných látek ze skupiny **bisdioxopiperazinů a aroylhydrazonů** se naše skupina zaměřila na sledování **osudu** těchto potenciálních léčiv v **biologických maticích** (buněčné médium, srdečních buňky, plazma).

Podářilo se nám vyvinout první **UHPLC-MS/MS** metodu pro stanovení **sobuzoxanu** a jeho předpokládaných metabolitů a **zkrátit dobu analýzy na 15 minut** (oproti dříve publikované metodě pro dexrazoxan s dobou analýzy 30 minut). Zjištěné poznatky o bioaktivaci/metabolizmu sobuzoxanu a ICRF-154 byly **porovnány s výsledky zjištěnými pro dexrazoxan** a pomohou dalšímu vývoji proléčiv bisdioxopiperazinů.

Pro srovnání stability nově syntetizovaných **derivátů SIH** byly vyvinuty jednoduché chromatografické metody s UV detekcí a použity pro **studium stability v buněčném médiu**. **Nejstabilnější derivát (látka 5)** byl následně podroben zkouškám pro zjištění schopnosti chelatace a **ochrany srdečních buněk** před oxidativním působením nejrůznějších látek.

5 Závěr

Práce v teoretické části popisuje metody používané pro úpravu vzorku před analýzou, u některých z nich včetně jejich miniaturizovaných podob, a princip a součásti hmotnostního detektoru používaného ve spojení s kapalinovou chromatografií. Dále se věnuje problematice vaznosti léčiv na plazmatické proteiny a jejího stanovení. Poslední část obsahuje základní informace o zkoumaných látkách.

V první části experimentální práce je popsána optimalizace metod pro stanovení vaznosti na plazmatické proteiny u potenciálního léčiva ze skupiny thiosemikarbazonů – DpC a pro studium osudu antracyklinu DAU při *in vitro* experimentech. Použití standardních metod pro stanovení vaznosti na proteiny u DpC je komplikováno jeho vysokou nespecifickou vazností na membrány. Pro určení volné frakce byla proto zkoušena dosud méně používaná metoda – mikroextrakce na pevnou fázi. Pro tuto specifickou aplikaci jsme si jednoduchým manuálním postupem připravili několik sérií vláken se sorbentem. Po optimalizaci postupu extrakce z hlediska extrakčního a desorpčního času a desorpčního činidla a ověření základních charakteristik jsme mohli metodu použít pro vlastní stanovení vaznosti DpC na bílkoviny v potkaní plazmě a roztoku BSA. Zjištěná hodnota vaznosti na plazmatické bílkoviny byla v souladu s hodnotami publikovanými v literatuře pro jiný thiosemikarbazon – Dp44mT a souhlasila i s vysokou nespecifickou vazností pozorovanou u těchto látek.

Dále jsme se zabývali vývojem UHPLC-MS metody pro současné stanovení DAU a jeho metabolitu DOL. Podařilo se nám vyvinout krátkou metodu vhodnou pro stanovení obou sledovaných látek v buněčném médiu, v pufrech, srdečních buňkách a plazmě a použít ji pro analýzu vzorků z *in vitro* studie ověřující potenciální kardioprotektivní účinek molsidominu, respektive jeho metabolitu SIN-1, na srdeční buňky. UHPLC-MS/MS analýza ukázala, že ztráta antracyklinové toxicity (vůči rakovinným i srdečním buňkám) při užití vyšších koncentrací SIN-1 je způsobena neočekávaným rozkladem DAU v buněčném médiu a kardioprotektivní účinek molsidominu tedy není přenositelný na model chronické kardiotoxicity způsobené antracykliny.

Ve druhé části experimentální práce jsme se zaměřili na vývoj bioanalytických metod pro stanovení vybraných látek s kardioprotektivním potenciálem. Vyvinuli jsme první UHPLC-MS metodu pro stanovení proléčiva sobuzoxanu, jeho aktivní formy a metabolitu v biologických matricích. Tato metoda byla následně použita pro analýzu

vzorků z *in vitro* experimentů zaměřených na hodnocení stability, aktivace a metabolismu sobuzoxanu a ICRF-154 v buněčném médiu, srdečních buňkách a králičí plazmě. Během experimentů jsme zjistili, že sobuzoxan rychle proniká do srdečních buněk, kde je aktivován na ICRF-154. K velmi rychlé aktivaci sobuzoxanu dochází také v plazmě. Zjištěné poznatky poslouží při dalším vývoji proléčiv látek ze skupiny bisdioxopiperazinů.

Poslední část je věnována vývoji LC-UV metod pro potenciální kardioprotektivní chelátory ze skupiny aroylhydrazonů. Studovány byly deriváty SIH vzniklé záměnou salicylaldehydové skupiny za 2,6-dihydroxybenzaldehydovou a lišící se substitucí v hydrazidové části molekuly. Během *in vitro* experimentů byla s pomocí vyvinutých metod porovnána stabilita jednotlivých derivátů a SIH. Ukázalo se, že významnější vliv na stabilitu hydrazonové vazby bude mít výsledná lipofilita látek (zvýšená například halogenací) než zkoumaná substituce na aromatickém jádře původního aldehydu. Nejstabilnější derivát (látka 5) současně vykazoval nejlepší cytoprotektivní účinek ze všech zkoumaných látek a svými vlastnostmi významně převyšoval i SIH.

6 Citovaná literatura

- [1] W.Li, J.Zhang, F.Tse, eds., Handbook of LC-MS bioanalysis: best practices, experimental protocols and regulations, 1 ed., Wiley, Hoboken, 2013.
- [2] T.Bohnert, L.Gan, Plasma protein binding: From discovery to development, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 102 (2013) 2953-2994. <https://doi.org/10.1002/jps.23614>.
- [3] C.Polson, P.Sarkar, B.Incedon, V.Raguvaran, R.Grant, Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*. vol. 785 (2003) 263-275. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00914-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00914-5).
- [4] L.Snyder, Introduction to modern liquid chromatography, 3. ed, John Wiley & Sons, New York, 2009.
- [5] L.Novakova, H.Vlckova, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation, *Analytica Chimica Acta*. vol. 656 (2009) 8-35. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.004>.
- [6] S.Hansen, S.Pedersen-Bjergaard, K.Rasmussen, Introduction to Pharmaceutical chemical analysis, 1st edition, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2012.
- [7] E.Thurman, M.Mills, Solid-Phase Extraction: Principles and Practice, 1st edition, John Wiley & Sons Ltd., New York, 1998.
- [8] L.Chen, H.Wang, Q.Zeng, Y.Xu, L.Sun, H.Xu, L.Ding, On-line Coupling of Solid-Phase Extraction to Liquid Chromatography--A Review, *Journal of Chromatographic Science*. vol. 47 (2009) 614-623. <https://doi.org/10.1093/chromsci/47.8.614>.
- [9] C.Bylda, R.Thiele, U.Kobold, D.Volmer, Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS, *The Analyst*. vol. 139 (2014). <https://doi.org/10.1039/c4an00094c>.
- [10] H.Kataoka, Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. vol. 396 (2010) 339-364. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3076-2>.
- [11] J.Ocaña-González, R.Fernández-Torres, M.Bello-López, M.Ramos-Payán, New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Analytica Chimica Acta*. vol. 905 (2016) 8-23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.041>.
- [12] A.Gjelstad, K.Rasmussen, M.Parmer, S.Pedersen-Bjergaard, Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid–liquid–liquid extraction in the 96-well format, *Bioanalysis*. vol. 5 (2013) 1377-1385. <https://doi.org/10.4155/bio.13.59>.
- [13] L.Yang, R.Said, M.Abdel-Rehim, Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review, *Journal of Chromatography B*. vol. 1043 (2017) 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.044>.

- [14] D.Bordin, M.Alves, E.de Campos, B.De Martinis, Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art, *Journal of Separation Science*. vol. 39 (2016) 1168-1172. <https://doi.org/10.1002/jssc.201500932>.
- [15] F.David, P.Sandra, Stir bar sorptive extraction for trace analysis, *Journal of Chromatography A*. vol. 1152 (2007) 54-69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.032>.
- [16] E.Boyacı, Á.Rodríguez-Lafuente, K.Gorynski, F.Mirnaghi, É.Souza-Silva, D.Hein, J.Pawliszyn, Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases, *Analytica Chimica Acta*. vol. 873 (2015) 14-30. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.12.051>.
- [17] L.Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *Journal of Chromatography A*. vol. 1221 (2012) 84-98. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.11.011>.
- [18] S.Risticevic, H.Lord, T.Górecki, C.Arthur, J.Pawliszyn, Protocol for solid-phase microextraction method development, *Nature Protocols*. vol. 5 (2010) 122-139. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.179>.
- [19] S.Zhou, K.Oakes, M.Servos, J.Pawliszyn, Application of Solid-Phase Microextraction for In Vivo Laboratory and Field Sampling of Pharmaceuticals in Fish, *Environmental Science & Technology*. vol. 42 (2008) 6073-6079. <https://doi.org/10.1021/es8001162>.
- [20] H.Peltenburg, I.Bosman, J.Hermens, Sensitive determination of plasma protein binding of cationic drugs using mixed-mode solid-phase microextraction, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. vol. 115 (2015) 534-542. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.08.002>.
- [21] D.Vuckovic, X.Zhang, E.Cudjoe, J.Pawliszyn, Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions, *Journal of Chromatography A*. vol. 1217 (2010) 4041-4060. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.061>.
- [22] M.Holcapek, C.Byrdwell, *Handbook of Advanced Chromatography /Mass Spectrometry Techniques*, 1st edition, Academic Press and AOCS Press, London, 2017.
- [23] L.Nováková, M.Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*, 1. vyd, Lucie Nováková, Praha [i.e. Hradec Králové], 2013.
- [24] T.Walter, R.Andrews, Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. vol. 63 (2014) 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.016>.
- [25] S.Wren, P.Tchelitcheff, Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development, *Journal of Chromatography A*. vol. 1119 (2006) 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.02.052>.
- [26] M.Lee, M.Zhu, *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Disposition: Basic Principles and Applications*, 1st edition, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA, 2011.

- [27] E.De Hoffmann, V.Stroobant, Mass spectrometry: principles and applications, 3rd ed, John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
- [28] J.Gross, Mass spectrometry: a textbook, 1st edition, Springer, Berlin, 2004.
- [29] M.Wilm, Principles of Electrospray Ionization, Molecular & Cellular Proteomics. vol. 10 (2011). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009407>.
- [30] Interfaces for LCMS, Shimadzu. (n.d.). https://www.shimadzu.com/an/lcms/support/fundamental/interfaces_for_lcms.html (accessed 2020-09-27).
- [31] H.Awad, M.Khamis, A.El-Aneed, Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization, Applied Spectroscopy Reviews. vol. 50 (2014) 158-175. <https://doi.org/10.1080/05704928.2014.954046>.
- [32] R.King, R.Bonfiglio, C.Fernandez-Metzler, C.Miller-Stein, T.Olah, Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization, Journal of the American Society for Mass Spectrometry. vol. 11 (2000) 942-950. [https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(00\)00163-X](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(00)00163-X).
- [33] S.Souverain, S.Rudaz, J.Veuthay, Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures, Journal of Chromatography A. vol. 1058 (2004) 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.118>.
- [34] A.El-Aneed, A.Cohen, J.Banoub, Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers, Applied Spectroscopy Reviews. vol. 44 (2009) 210-230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.
- [35] Introduction to mass analyzers, Shimadzu. (n.d.). https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/fundamental/mass_analyzers.html (accessed 2020-10-10).
- [36] M.Holčapek, R.Jirásko, M.Lísa, Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques, Journal of Chromatography A. vol. 1259 (2012) 3-15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.072>.
- [37] Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer, Creative Proteomics. (n.d.). <https://www.creative-proteomics.com/support/q-exactive-hybrid-quadrupole-orbitrap-mass-spectrometer.htm> (accessed 2020-10-10).
- [38] A.Makarov, Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis, Analytical Chemistry. vol. 72 (2000) 1156-1162. <https://doi.org/10.1021/ac991131p>.
- [39] Q.Xu, T.Madden, eds., LC-MS in Drug Bioanalysis, Springer US, Boston, MA, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3828-1>.
- [40] F.Musteata, J.Pawliszyn, M.Qian, J.Wu, G.Miwa, Determination of drug plasma protein binding by solid phase microextraction, Journal of Pharmaceutical Sciences. vol. 95 (2006) 1712-1722. <https://doi.org/10.1002/jps.20558>.

- [41] M.Banker, T.Clark, Plasma / Serum Protein Binding Determinations, *Current Drug Metabolism*. vol. 9 (2008) 854-859. <https://doi.org/10.2174/138920008786485065>.
- [42] L.Nilsson, S.Schmidt, Simultaneous determination of total and free drug plasma concentrations combined with batch-wise pH-adjustment for the free concentration determinations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. vol. 24 (2001) 921-927. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00560-4](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00560-4).
- [43] H.Lüllmann, K.Mohr, L.Hein, *Barevný atlas farmakologie*, Vyd. 3., české, Grada, Praha, 2007.
- [44] S.Schmidt, D.Gonzalez, H.Derendorf, Significance of Protein Binding in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 99 (2010) 1107-1122. <https://doi.org/10.1002/jps.21916>.
- [45] D.Hage, High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding, *Journal of Chromatography B*. vol. 768 (2002) 3-30. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00482-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00482-0).
- [46] R.Mallik, M.Yoo, S.Chen, D.Hage, Studies of verapamil binding to human serum albumin by high-performance affinity chromatography, *Journal of Chromatography B*. vol. 876 (2008) 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.022>.
- [47] N.Heegaard, S.Nilsson, N.Guzman, Affinity capillary electrophoresis: important application areas and some recent developments, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. vol. 715 (1998) 29-54. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00258-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00258-8).
- [48] Y.Tanaka, S.Terabe, Estimation of binding constants by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography B*. vol. 768 (2002) 81-92. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00488-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00488-1).
- [49] S.Singh, N.Kishore, Calorimetric and Spectroscopic Studies on the Interaction of Methimazole with Bovine Serum Albumin, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 97 (2008) 2362-2372. <https://doi.org/10.1002/jps.21140>.
- [50] B.Bojko, D.Vuckovic, J.Pawliszyn, Comparison of solid phase microextraction versus spectroscopic techniques for binding studies of carbamazepine, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. vol. 66 (2012) 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.03.005>.
- [51] M.McCallum, A.Pawlak, W.Shadrick, A.Simeonov, A.Jadhav, A.Yasgar, D.Maloney, L.Arnold, A fluorescence-based high throughput assay for the determination of small molecule–human serum albumin protein binding, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. vol. 406 (2014) 1867-1875. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7560-3>.
- [52] D.Epps, T.Raub, V.Caiolfa, A.Chiari, M.Zamai, Determination of the Affinity of Drugs toward Serum Albumin by Measurement of the Quenching of the Intrinsic Tryptophan Fluorescence of the Protein, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. vol. 51 (1999) 41-48. <https://doi.org/10.1211/0022357991772079>.

- [53] C.Breen, M.Raverdeau, H.Voorheis, Development of a quantitative fluorescence-based ligand-binding assay, *Scientific Reports*. vol. 6 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep25769>.
- [54] K.Vuignier, J.Schappler, J.Veuthey, P.Carrupt, S.Martel, Drug–protein binding: a critical review of analytical tools, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. vol. 398 (2010) 53-66. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3737-1>.
- [55] B.Buscher, S.Laakso, H.Mascher, K.Pusecker, M.Doig, L.Dillen, W.Wagner-Redeker, T.Pfeifer, P.Delrat, P.Timmerman, Bioanalysis for plasma protein binding studies in drug discovery and drug development: views and recommendations of the European Bioanalysis Forum, *Bioanalysis*. vol. 6 (2014) 673-682. <https://doi.org/10.4155/bio.13.338>.
- [56] A.Fura, T.Harper, H.Zhang, L.Fung, W.Shyu, Shift in pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. vol. 32 (2003) 513-522. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00159-6](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00159-6).
- [57] Centrifree Ultrafiltration Device, (n.d.). https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Centrifree-Ultrafiltration-Device,MM_NF-C933 (accessed 2020-09-20).
- [58] J.Oravcová, B.Böhs, W.Lindner, Drug-protein binding studies new trends in analytical and experimental methodology, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. vol. 677 (1996) 1-28. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00425-4](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00425-4).
- [59] B.Bojko, E.Cudjoe, G.Gómez-Ríos, K.Gorynski, R.Jiang, N.Reyes-Garcés, S.Risticovic, É.Silva, O.Togunde, D.Vuckovic, J.Pawliszyn, SPME – Quo vadis?, *Analytica Chimica Acta*. vol. 750 (2012) 132-151. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.052>.
- [60] M.Heringa, J.Hermens, Measurement of free concentrations using negligible depletion-solid phase microextraction (nd-SPME), *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. vol. 22 (2003) 575-587. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01006-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01006-9).
- [61] W.Vaes, E.Urrestarazu Ramos, H.Verhaar, W.Seinen, J.Hermens, Measurement of the Free Concentration Using Solid-Phase Microextraction: Binding to Protein, *Analytical Chemistry*. vol. 68 (1996) 4463-4467. <https://doi.org/10.1021/ac960337c>.
- [62] J.Poerschmann, Z.Zhang, F.Kopinke, J.Pawliszyn, Solid Phase Microextraction for Determining the Distribution of Chemicals in Aqueous Matrices, *Analytical Chemistry*. vol. 69 (1997) 597-600. <https://doi.org/10.1021/ac9609788>.
- [63] G.Theodoridis, Application of solid-phase microextraction in the investigation of protein binding of pharmaceuticals, *Journal of Chromatography B*. vol. 830 (2006) 238-244. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.050>.
- [64] D.Lovejoy, D.Sharp, N.Seebacher, P.Obeidy, T.Prichard, C.Stefani, M.Basha, P.Sharpe, P.Jansson, D.Kalinowski, P.Bernhardt, D.Richardson, Novel Second-Generation Di-2-Pyridylketone Thiosemicarbazones Show Synergism with Standard Chemotherapeutics and Demonstrate Potent Activity against Lung Cancer Xenografts after Oral and Intravenous Administration in Vivo, *Journal of Medicinal Chemistry*. vol. 55 (2012) 7230-7244. <https://doi.org/10.1021/jm300768u>.

- [65] D.Richardson, D.Kalinowski, S.Lau, P.Jansson, D.Lovejoy, Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. vol. 1790 (2009) 702-717. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.04.003>.
- [66] Z.Kovacevic, S.Chikhani, D.Lovejoy, D.Richardson, Novel Thiosemicarbazone Iron Chelators Induce Up-Regulation and Phosphorylation of the Metastasis Suppressor N-myc Down-Stream Regulated Gene 1: A New Strategy for the Treatment of Pancreatic Cancer, *Molecular Pharmacology*. vol. 80 (2011) 598-609. <https://doi.org/10.1124/mol.111.073627>.
- [67] A.Merlot, S.Sahni, D.Lane, A.Fordham, N.Pantarat, D.Hibbs, V.Richardson, M.Doddareddy, J.Ong, M.Huang, D.Richardson, D.Kalinowski, Potentiating the cellular targeting and anti-tumor activity of Dp44mT via binding to human serum albumin: two saturable mechanisms of Dp44mT uptake by cells, *Oncotarget*. vol. 6 (2015) 10374-10398. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3606>.
- [68] P.Jansson, D.Kalinowski, D.Lane, Z.Kovacevic, N.Seebacher, L.Fouani, S.Sahni, A.Merlot, D.Richardson, The renaissance of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: Inhibition of the “Triad of Death” in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones, *Pharmacological Research*. vol. 100 (2015) 255-260. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.013>.
- [69] N.Seebacher, D.Richardson, P.Jansson, A mechanism for overcoming P-glycoprotein-mediated drug resistance: novel combination therapy that releases stored doxorubicin from lysosomes via lysosomal permeabilization using Dp44mT or DpC, *Cell Death & Disease*. vol. 7 (2016) e2510-e2510. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.381>.
- [70] Y.Yu, D.Kalinowski, Z.Kovacevic, A.Siafakas, P.Jansson, C.Stefani, D.Lovejoy, P.Sharpe, P.Bernhardt, D.Richardson, Thiosemicarbazones from the Old to New: Iron Chelators That Are More Than Just Ribonucleotide Reductase Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*. vol. 52 (2009) 5271-5294. <https://doi.org/10.1021/jm900552r>.
- [71] J.Knox, S.Hotte, C.Kollmannsberger, E.Winqvist, B.Fisher, E.Eisenhauer, Phase II study of Triapine® in patients with metastatic renal cell carcinoma: a trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC IND.161), *Investigational New Drugs*. vol. 25 (2007) 471-477. <https://doi.org/10.1007/s10637-007-9044-9>.
- [72] P.Quach, E.Gutierrez, M.Basha, D.Kalinowski, P.Sharpe, D.Lovejoy, P.Bernhardt, P.Jansson, D.Richardson, Methemoglobin Formation by Triapine, Di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT), and Other Anticancer Thiosemicarbazones: Identification of Novel Thiosemicarbazones and Therapeutics That Prevent This Effect, *Molecular Pharmacology*. vol. 82 (2012) 105-114. <https://doi.org/10.1124/mol.112.078964>.
- [73] Dose-finding and Pharmacokinetic Study of DpC, Administered Orally to Patients With Advanced Solid Tumors, *ClinicalTrials.gov*. (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02688101> (accessed 2020-08-15).
- [74] V.Sestak, J.Stariat, J.Cermanova, E.Potuckova, J.Chladek, J.Roh, J.Bures, H.Jansova, P.Prusa, M.Sterba, S.Micuda, T.Simunek, D.Kalinowski, D.Richardson, P.Kovarikova, Novel and potent anti-tumor and anti-metastatic di-2-pyridylketone thiosemicarbazones

- demonstrate marked differences in pharmacology between the first and second generation lead agents, *Oncotarget*. vol. 6 (2015) 42411-42428. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6389>.
- [75] J.Suchopár, *Compendium : léčiva používaná v podmínkách ČR.*, 5. vydání, Panax, Praha, 2018.
- [76] Státní ústav pro kontrolu léčiv - databáze léků, (n.d.). <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php> (accessed 2020-09-10).
- [77] T.Andoh, Bis(2,6-dioxopiperazines), catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II, as molecular probes, cardioprotectors and antitumor drugs, *Biochimie*. vol. 80 (1998) 235-246. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(98\)80006-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(98)80006-0).
- [78] T.Andoh, R.Ishida, Catalytic inhibitors of DNA topoisomerase II, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. vol. 1400 (1998) 155-171. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00133-X).
- [79] N.Bachur, F.Yu, R.Johnson, Y.Hickey, L.Malkas, Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents, 41 (1992) 993-8. <https://molpharm.aspetjournals.org/content/41/6/993.long> (accessed 2020-10-02).
- [80] L.Swift, S.Cutts, A.Nudelman, I.Levovich, A.Rephaeli, D.Phillips, The cardio-protecting agent and topoisomerase II catalytic inhibitor sobuzoxane enhances doxorubicin-DNA adduct mediated cytotoxicity, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. vol. 61 (2008) 739-749. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0528-2>.
- [81] H.Mizutani, S.Tada-Oikawa, Y.Hiraku, M.Kojima, S.Kawanishi, Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide, *Life Sciences*. vol. 76 (2005) 1439-1453. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.05.040>.
- [82] R.Jones, C.Swanton, M.Ewer, Anthracycline cardiotoxicity, *Expert Opinion on Drug Safety*. vol. 5 (2006) 791-809. <https://doi.org/10.1517/14740338.5.6.791>.
- [83] M.Sterba, O.Popelova, A.Vavrova, E.Jirkovsky, P.Kovarikova, V.Gersl, T.Simunek, Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection, *Antioxidants & Redox Signaling*. vol. 18 (2013) 899-929. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4795>.
- [84] P.Henriksen, Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention, *Heart*. vol. 104 (2018) 971-977. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-312103>.
- [85] B.Hasinoff, E.Herman, Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug?, *Cardiovascular Toxicology*. vol. 7 (2007) 140-144. <https://doi.org/10.1007/s12012-007-0023-3>.
- [86] P.Vejpongsa, E.Yeh, Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity:Challenges and Oportunities, *Journal of the American College of Cardiology*. vol. 64 (2014) 938-945. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.06.1167>.
- [87] A.Slupe, B.Williams, C.Larson, L.Lee, T.Primbs, A.Bruesch, C.Bjorklund, D.Warner, J.Peloquin, S.Shadle, H.Gambliel, B.Cusack, R.Olson, H.Charlier, Reduction of 13-

- Deoxydoxorubicin and Daunorubicinol Anthraquinones by Human Carbonyl Reductase, *Cardiovascular Toxicology*. vol. 5 (2005) 365-376. <https://doi.org/10.1385/CT:5:4:365>.
- [88] R.Olson, P.Mushlin, D.Brenner, S.Fleischer, B.Cusack, B.Chang, R.Boucek, Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. vol. 85 (1988) 3585-3589. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.10.3585>.
- [89] B.Cusack, S.Young, R.Olson, Daunorubicin and daunorubicinol pharmacokinetics in plasma and tissues in the rat, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. vol. 35 (1995) 213-218. <https://doi.org/10.1007/BF00686550>.
- [90] D.Platel, S.Bonoron-Adele, J.Robert, Role of Daunorubicinol in Daunorubicin-Induced Cardiotoxicity as Evaluated with the Model of Isolated Perfused Rat Heart, *Pharmacology and Toxicology*. vol. 88 (2001) 250-254. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2001.d01-112.x>.
- [91] R.Ishida, T.Miki, T.Narita, R.Yui, M.Sato, K.Utsumi, K.Tanabe, T.Andoh, Inhibition of intracellular topoisomerase II by antitumor bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives: mode of cell growth inhibition distinct from that of cleavable complex-forming type inhibitors, *Cancer Research*. 51 (1991) 4909-16.
- [92] N.Shipp, R.Dorr, D.Alberts, B.Dawson, M.Hendrix, Characterization of experimental mitoxantrone cardiotoxicity and its partial inhibition by ICRF-187 in cultured neonatal rat heart cells, *Cancer Research*. 53 (1993) 550-556.
- [93] F.Testore, S.Milanese, M.Ceste, E.de Conciliis, G.Parello, C.Lanfranco, R.Manfredi, G.Ferrero, C.Simoni, L.Miglietta, S.Ferro, L.Giaretto, G.Bosso, Cardioprotective Effect of Dexrazoxane in Patients with Breast Cancer Treated with Anthracyclines in Adjuvant Setting, *American Journal of Cardiovascular Drugs*. vol. 8 (2008) 257-263. <https://doi.org/10.2165/00129784-200808040-00005>.
- [94] T.Narita, Y.Koide, S.Yaguchi, S.Kimura, Y.izumisawa, M.Takase, M.Inaba, S.Tsukagoshi, Antitumor activities and schedule dependence of orally administered MST-16, a novel derivative of bis(2,6-dioxopiperazine), *CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY*. 28 (1991) 235-240. <https://doi.org/10.1007/BF00685528>.
- [95] D.Kalinowski, D.Richardson, The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer, *Pharmacological Reviews*. vol. 57 (2005) 547-583. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.2>.
- [96] J.Buss, F.Torti, S.Torti, The Role of Iron Chelation in Cancer Therapy, *Current Medicinal Chemistry*. vol. 10 (2003) 1021-1034. <https://doi.org/10.2174/0929867033457638>.
- [97] M.Sterba, O.Popelova, T.Simunek, Y.Mazurova, A.Potacova, M.Adamcova, H.Kaiserova, P.Ponka, V.Gersl, Cardioprotective Effects of a Novel Iron Chelator, Pyridoxal 2-Chlorobenzoyl Hydrazone, in the Rabbit Model of Daunorubicin-Induced Cardiotoxicity, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. vol. 319 (2006) 1336-1347. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.111468>.
- [98] H.Kaiserova, T.Simunek, M.Sterba, G.den Hartog, L.Schroterova, O.Popelova, V.Gersl, E.Kvasnickova, A.Bast, New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity,

- Cardiovascular Toxicology. vol. 7 (2007) 145-150. <https://doi.org/10.1007/s12012-007-0020-6>.
- [99] M.Horackova, P.Ponka, Z.Byczko, The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H₂O₂ injury in adult cardiomyocytes, *Cardiovascular Research*. vol. 47 (2000) 529-536. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00088-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00088-2).
- [100] T.Simunek, C.Boer, R.Bouwman, R.Vlasblom, A.Versteilen, M.Sterba, V.Gersl, R.Hrdina, P.Ponka, J.de Lange, W.Paulus, R.Musters, SIH—a novel lipophilic iron chelator—protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. vol. 39 (2005) 345-354. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.05.008>.
- [101] P.Haskova, P.Kovarikova, L.Koubkova, A.Vavrova, E.Mackova, T.Simunek, Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity, *Free Radical Biology and Medicine*. vol. 50 (2011) 537-549. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.004>.
- [102] M.Sterba, O.Popelova, T.Simunek, Y.Mazurova, A.Potacova, M.Adamcova, I.Guncova, H.Kaiserova, V.Palicka, P.Ponka, V.Gersl, Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: A study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH), *Toxicology*. vol. 235 (2007) 150-166. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.03.020>.
- [103] P.Kovarikova, Z.Mrkvickova, J.Klimes, Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. vol. 47 (2008) 360-370. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.01.011>.
- [104] K.Hruskova, P.Kovarikova, P.Bendova, P.Haskova, E.Mackova, J.Stariat, A.Vavrova, K.Vavrova, T.Simunek, Synthesis and Initial in Vitro Evaluations of Novel Antioxidant Aroylhydrazone Iron Chelators with Increased Stability against Plasma Hydrolysis, *Chemical Research in Toxicology*. vol. 24 (2011) 290-302. <https://doi.org/10.1021/tx100359t>.
- [105] E.Potůčková, K.Hrušková, J.Bureš, P.Kovaříková, I.Špírková, K.Pravdíková, L.Kolbabová, T.Hergeselová, P.Hašková, H.Jansová, M.Macháček, A.Jirkovská, V.Richardson, D.Lane, D.Kalinowski, D.Richardson, K.Vávrová, T.Šimůnek, K.Pantopoulos, Structure-Activity Relationships of Novel Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone (SIH) Analogs: Iron Chelation, Anti-Oxidant and Cytotoxic Properties, *PLoS ONE*. vol. 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112059>.
- [106] J.Bures, H.Jansova, J.Stariat, T.Filipsky, P.Mladenka, T.Simunek, R.Kucera, J.Klimes, Q.Wang, K.Franz, P.Kovarikova, LC–UV/MS methods for the analysis of prochelator—Boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (BSIH) and its active chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. vol. 105 (2015) 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.044>.
- [107] K.Hrušková, E.Potůčková, T.Hergeselová, L.Liptáková, P.Hašková, P.Mingas, P.Kovaříková, T.Šimůnek, K.Vávrová, Aroylhydrazone iron chelators: Tuning antioxidant and antiproliferative properties by hydrazide modifications, *European*

- Journal of Medicinal Chemistry. vol. 120 (2016) 97-110.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.015>.
- [108] K.Lee, R.Mower, T.Hollenbeck, J.Castelo, N.Johnson, P.Gordon, P.Sinko, K.Holme, Y.Lee, Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies, *Pharmaceutical Research*. vol. 20 (2003) 1015-1021.
<https://doi.org/10.1023/A:1024406221962>.
- [109] S.Silvester, F.Zang, Overcoming non-specific adsorption issues for AZD9164 in human urine samples: Consideration of bioanalytical and metabolite identification procedures, *Journal of Chromatography B*. 893-894 (2012) 134-143.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.004>.
- [110] T.Górecki, Effect of Sample Volume on Quantitative Analysis by Solid-phase Microextraction Part 1. Theoretical Considerations, *The Analyst*. vol. 122 (1997) 1079-1086. <https://doi.org/10.1039/a701303e>.
- [111] N.Reyes-Garcés, B.Bojko, D.Hein, J.Pawliszyn, Solid Phase Microextraction Devices Prepared on Plastic Support as Potential Single-Use Samplers for Bioanalytical Applications, *Analytical Chemistry*. vol. 87 (2015) 9722-9730.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01849>.
- [112] K.Poon, P.Lam, M.Lam, Determination of polychlorinated biphenyls in human blood serum by SPME, *Chemosphere*. vol. 39 (1999) 905-912. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00033-8).
- [113] B.Rosenkranz, B.Winkelmann, M.Parnham, Clinical Pharmacokinetics of Molsidomine, *Clinical Pharmacokinetics*. vol. 30 (1996) 372-384. <https://doi.org/10.2165/00003088-199630050-00004>.
- [114] S.Omar, A.Webb, Nitrite reduction and cardiovascular protection, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. vol. 73 (2014) 57-69.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.01.012>.
- [115] J.Calvert, D.Lefer, Myocardial protection by nitrite, *Cardiovascular Research*. vol. 83 (2009) 195-203. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp079>.
- [116] B.Cusack, P.Mushlin, L.Voulelis, X.Li, R.Boucek, R.Olson, Daunorubicin-Induced Cardiac Injury in the Rabbit: A Role for Daunorubicinol?, *Toxicology and Applied Pharmacology*. vol. 118 (1993) 177-185. <https://doi.org/10.1006/taap.1993.1023>.
- [117] G.Zagotto, B.Gatto, S.Moro, C.Sissi, M.Palumbo, Anthracyclines: recent developments in their separation and quantitation, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. vol. 764 (2001) 161-171. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00346-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00346-2).
- [118] K.Maudens, C.Stove, V.Cocquyt, H.Denys, W.Lambert, Development and validation of a liquid chromatographic method for the simultaneous determination of four anthracyclines and their respective 13-S-dihydro metabolites in plasma and saliva, *Journal of Chromatography B*. vol. 877 (2009) 3907-3915.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.09.044>.

- [119] S.Ahmed, N.Kishikawa, K.Ohyama, M.Wada, K.Nakashima, N.Kuroda, Selective determination of doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by HPLC with photosensitization reaction followed by chemiluminescence detection, *Talanta*. vol. 78 (2009) 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.043>.
- [120] F.Lachâtre, P.Marquet, S.Ragot, J.Gaulier, P.Cardot, J.Dupuy, Simultaneous determination of four anthracyclines and three metabolites in human serum by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. vol. 738 (2000) 281-291. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00529-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00529-0).
- [121] Y.Yang, Development and validation of a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for quantification of daunorubicin in rat plasma, *Talanta*. vol. 71 (2007) 596-604. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.05.003>.
- [122] S.Urva, B.Shin, V.Yang, J.Balthasar, Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assessment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma and tissues, *Journal of Chromatography B*. vol. 877 (2009) 837-841. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.02.018>.
- [123] R.Wall, G.McMahon, J.Crown, M.Clynes, R.O'Connor, Rapid and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the quantitation of epirubicin and identification of metabolites in biological samples, *Talanta*. vol. 72 (2007) 145-154. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.10.010>.
- [124] FDA – CDER and CVM, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, (2018). <https://www.fda.gov/media/70858/download> (accessed 2020-08-16).
- [125] T.Okamoto, Y.Nishimura, S.Yamada, S.Yamada, T.Itoh, A.Mori, K.Saheki, M.Okada, H.Takatsuka, H.Wada, A.Tamura, Y.Fujimori, E.Kakishita, Long-Term Administration of Oral Low-Dose Topoisomerase II Inhibitors, MST-16 and VP-16, for Refractory or Relapsed Non-Hodgkin's Lymphoma, *Acta Haematologica*. vol. 104 (2001) 128-130. <https://doi.org/10.1159/000039746>.
- [126] B.Hasinoff, K.Hellmann, E.Herman, V.Ferrans, Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines, *Current Medicinal Chemistry*. 5 (1998) 1-28. http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=16&SID=D2e9qg1Fk2MBIRAFa26&page=1&doc=1 (accessed 2020-08-13).
- [127] J.Bures, A.Jirkovska, V.Sestak, H.Jansova, G.Karabanovich, J.Roh, M.Sterba, T.Simunek, P.Kovarikova, Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite, *Toxicology*. vol. 392 (2017) 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.09.012>.
- [128] P.Kovarikova, I.Pasakova-Vrbatova, A.Vavrova, J.Stariat, J.Klimes, T.Simunek, Development of LC–MS/MS method for the simultaneous analysis of the cardioprotective drug dexrazoxane and its metabolite ADR-925 in isolated cardiomyocytes and cell culture medium, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. vol. 76 (2013) 243-251. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.12.024>.

- [129] P.Kovarikova, J.Stariat, J.Klimes, K.Hruskova, K.Vavrova, Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of a moderately lipophilic drug from its highly polar metabolites—the cardioprotectant dexrazoxane as a model case, *Journal of Chromatography A*. vol. 1218 (2011) 416-426.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.11.050>.
- [130] H.Jansová, J.Bureš, M.Macháček, P.Hašková, A.Jirkovská, J.Roh, Q.Wang, K.Franz, P.Kovaříková, T.Šimůnek, Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products, *Toxicology*. 350-352 (2016) 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.03.004>.
- [131] S.Pauwels, I.Jans, N.Peersman, J.Billen, D.Vanderschueren, K.Desmet, P.Vermeersch, Possibilities and limitations of signal summing for an immunosuppressant LC-MS/MS method, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. vol. 407 (2015) 6191-6199.
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8799-7>.
- [132] S.Pauwels, L.Antonio, I.Jans, A.Lintermans, P.Neven, F.Claessens, B.Decallonne, J.Billen, D.Vanderschueren, P.Vermeersch, Sensitive routine liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for serum estradiol and estrone without derivatization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. vol. 405 (2013) 8569-8577.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7259-5>.
- [133] U.Hassan, M.Anwar, Reducing noise by repetition: introduction to signal averaging, *European Journal of Physics*. vol. 31 (2010) 453-465. <https://doi.org/10.1088/0143-0807/31/3/003>.
- [134] EMEA – CHMP, Guideline on Validation of Bioanalytical Methods, (n.d.).
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-guideline-validation-bioanalytical-methods_en.pdf (accessed 2020-08-16).
- [135] T.Kurz, B.Gustafsson, U.Brunk, Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage, *FEBS Journal*. vol. 273 (2006) 3106-3117.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05321.x>.
- [136] P.Bendova, E.Mackova, P.Haskova, A.Vavrova, E.Jirkovsky, M.Sterba, O.Popelova, D.Kalinowski, P.Kovarikova, K.Vavrova, D.Richardson, T.Simunek, Comparison of Clinically Used and Experimental Iron Chelators for Protection against Oxidative Stress-Induced Cellular Injury, *Chemical Research in Toxicology*. vol. 23 (2010) 1105-1114.
<https://doi.org/10.1021/tx100125t>.

7 Seznam publikací zahrnutých v dizertační práci

Reimerová P., Stariat J., Bavlovič Piskáčková H., Jansová H., Roh J., Kalinowski D.S., Macháček M., Šimůnek T., Richardson D.R., Štěrbová-Kovaříková P.

Novel SPME fibers based on a plastic support for determination of plasma protein binding of thiosemicarbazone metal chelators: a case example of DpC, an anti-cancer drug that entered clinical trials

Analytical and Bioanalytical Chemistry 2019; 411(11):2383-2394

IF₂₀₁₉=3,637 (Q1/Q1)

Podíl autorky: experimentální práce (příprava SPME vláken a optimalizace metody, stanovení vaznosti, optimalizace a validace LC-MS metody), zpracování a interpretace analytických dat, hlavní podíl na tvorbě textu publikace.

Lenčová-Popelová O., Jansová H., Jirkovský E., Bureš J., Jirkovská-Vávrová A., Mazurová Y., Reimerová P., Vostatková L., Adamcová M., Hroch M., Pokorná Z., Kovaříková P., Šimůnek T., Štěrba M.

Are cardioprotective effects of NO-releasing drug molsidomine translatable to chronic anthracycline cardiotoxicity settings?

Toxicology 2016; 372:52-63

IF₂₀₁₆=3,582 (Q1/Q1)

Podíl autorky: podíl na experimentální práci (částečný podíl na hodnocení stability daunorubicinu v DMEM, ADS a PBS pufru a plazmě), podíl na tvorbě textu publikace.

Reimerová P., Jirkovská A., Bavlovič Piskáčková H., Karabanovich G., Roh J., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P.

UHPLC-MS/MS method for analysis of sobuzoxane, its active form ICRF-154 and metabolite EDTA-diamide and its application to bioactivation study.

Scientific Reports 2019; 14:9(1):4524

IF₂₀₁₉=3,998 (Q1)

Podíl autorky: experimentální práce (vývoj a validace LC-MS metody, studium stability a bioaktivace *in vitro*) a zpracování a interpretace analytických dat, hlavní podíl na tvorbě textu publikace.

Jansová H., Kubeš J., Reimerová P., Štěrbová-Kovaříková P., Roh J., Šimůnek T.
2,6-Dihydroxybenzaldehyde Analogues of the Iron Chelator Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone: Increased Hydrolytic Stability and Cytoprotective Activity against Oxidative Stress.

Chemical Research in Toxicology 2018; 19; 31(11):1151-1163

IF₂₀₁₈=3,274 (Q2/Q2/Q2)

Podíl autorky: experimentální práce (vývoj LC-UV metod, hodnocení stability derivátů SIH v buněčném médiu *in vitro*) a zpracování analytických dat, podíl na tvorbě textu publikace.

8 Prezentace výsledků na konferencích

8.1 Přednášky

Reimerová P., Piskáčková H., Jirkovská A., Štěrbová P.

UHPLC-MS/MS stability study of sobuzoxane and its active form - ICRF-154 in biological matrices

8. Postgraduální a 6. Postdockingá vědecká konference, 24. – 25.1.2018, Hradec Králové

Reimerová P., Piskáčková H., Kovaříková P.

Bioanalytické hodnocení sobuzoxanu

Pravidelný seminář - UNCE – Centrum pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém; 19.5.2017, Hradec Králové

Reimerová P., Čalkovská N., Jirkovská A., Hergeselová T., Kovaříková P.

UHPLC-MS/MS method for stability study of sobuzoxane in biological matrices

7. Postgraduální a 5. Postdockingá vědecká konference, 7. - 8. 2. 2017, Hradec Králové

Reimerová P., Stariat J., Kovaříková P.

Using solid-phase microextraction for plasma protein binding study of DpC

6. Postgraduální a 4. Postdockingá vědecká konference, 9. - 10. 2. 2016, Hradec Králové

8.2 Plakátová sdělení

Reimerová P., Stariat J., Roh J., Jansová H., Macháček M., Kalinowski D.S., Šimůnek T., Richardson D.R., Kovaříková P.

SPME as a tool for determination of plasma protein binding of a novel anti-cancer drug – DpC

Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2018, 29.1. - 1.2.2018, Olomouc, Česká republika – Best Poster Prize

Reimerová P., Jirkovská A., Piskáčková H., Karabanovich G., Roh J., Kovaříková P.

***In vitro* bioactivation study of a pro-drug sobuzoxane in plasma and cardiac cells**

45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2017), 18. - 22.6.2017, Praha, Česká republika

Reimerová P., Jirkovská A., Piskáčková H., Karabanovich G., Roh J., Kovaříková P.

***In vitro* bioactivation study of a new antiproliferative drug sobuzoxane in biological matrices**

14th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis (CECE 2017), 8. - 11.10.2017, Veszprém, Maďarsko

Reimerová P., Čalkovská N., Hergeselová T., Škoda J., Roh J., Kovaříková P.

Development of UHPLC-MS/MS method for a pilot bioactivation study of sobuzoxane

31st International Symposium on Chromatography (ISC 2016), 28.8. - 1.9.2016, Cork, Irsko

Reimerová P., Čalkovská N., Hergeselová T., Škoda J., Karabanovich G., Roh J., Kovaříková P.

UHPLC-MS/MS method for analysis of sobuzoxane and its metabolite in biological materials

Advances in Chromatography and Electrophoresis 2016 & Chiranal 2016, 6. - 9.6.2016, Olomouc, Česká republika

Reimerová P., Čalkovská N., Roh J., Škoda J., Hergeselová T., Kovaříková P.

Development of analytical method for simultaneous analysis of sobuzoxane and its metabolites/degradation products

12th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis (CECE 2015), 21. - 23.9.2015, Brno, Česká republika

Reimerová P., Stariat J., Klimeš J., Richardson D.R., Pawliszyn J., Kovaříková P.

Determination of plasma protein binding of novel anticancer drug using solid-phase microextraction

26th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical analysis (JPBA 2015),
4. - 8.7.2015, Tbilisi, Gruzie

9 Účast v grantech

9.1 Hlavní řešitel

2015 – 2018 – Grantová agentura Univerzity Karlovy (344 615): „*Komplexní analytická a bioanalytická studie sobuzoxanu - nového protinádorového léčiva*“

9.2 Člen kolektivu

2017 a 2018 Grantová agentura Univerzity Karlovy (1550217): „*Využití UHPLC-MS/MS pro studium osudu nových kardioprotektiv v srdečních buňkách a organismu*“

2014 – 2017 UNCE 204019 – Centrum pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém

10 Přílohy

10.1 Příloha číslo 1

Reimerová P., Stariat J., Bavlovič Piskáčková H., Jansová H., Roh J., Kalinowski D.S., Macháček M., Šimůnek T., Richardson D.R., Štěrbová-Kovaříková P.

Novel SPME fibers based on a plastic support for determination of plasma protein binding of thiosemicarbazone metal chelators: a case example of DpC, an anti-cancer drug that entered clinical trials

Analytical and Bioanalytical Chemistry 2019; 411(11):2383-2394

IF₂₀₁₉=3,637 (Q1/Q1)

10.2 Příloha číslo 2

Lenčová-Popelová O., Jansová H., Jirkovský E., Bureš J., Jirkovská-Vávrová A., Mazurová Y., Reimerová P., Vostatková L., Adamcová M., Hroch M., Pokorná Z., Kovaříková P., Šimůnek T., Štěrba M.

Are cardioprotective effects of NO-releasing drug molsidomine translatable to chronic anthracycline cardiotoxicity settings?

Toxicology 2016; 372:52-63

IF₂₀₁₆=3,582 (Q1/Q1)

Supplementary Figure

Lenčová-Popelová O., Jansová H., Jirkovský E., Bureš J., Jirkovská-Vávrová A., Mazurová Y., Reimerová P., Vostatková L., Adamcová M., Hroch M., Pokorná Z., Kovaříková P., Šimůnek T., Štěrba M.

Are cardioprotective effects of NO-releasing drug molsidomine translatable to chronic anthracycline cardiotoxicity settings?

Toxicology 2016; 372:52-63

IF₂₀₁₆=3,582 (Q1/Q1)

10.3 Příloha číslo 3

Reimerová P., Jirkovská A., Bavlovič Piskáčková H., Karabanovich G., Roh J., Šimůnek T., Štěrbová-Kovaříková P.

UHPLC-MS/MS method for analysis of sobuzoxane, its active form ICRF-154 and metabolite EDTA-diamide and its application to bioactivation study.

Scientific Reports 2019; 14;9(1):4524

IF₂₀₁₉=3,998 (Q1)

10.4 Příloha číslo 4

Jansová H., Kubeš J., Reimerová P., Štěrbová-Kovaříková P., Roh J., Šimůnek T.

2,6-Dihydroxybenzaldehyde Analogues of the Iron Chelator Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone: Increased Hydrolytic Stability and Cytoprotective Activity against Oxidative Stress.

Chemical Research in Toxicology 2018; 19; 31(11):1151-1163

IF₂₀₁₈=3,274 (Q2/Q2/Q2)