

Oponentský posudek na disertační práci „Využití LC-MS v bioanalýze antracyklinů a potenciálních kardioprotektiv“ předkládané Mgr. Hanou Bavlovič Piskáčkovou

Předkládaná práce je založena na čtyřech pracích, publikovaných v renomovaných mezinárodních časopisech.

Práci uvozuje teoretická část, shrnující poznatky z oblasti využití LC-MS v bioanalýze léčiv, úpravy biologického materiálu, elektromembránové extrakce a validace bioanalytických chromatografických metod. Teoretická část je napsána pečlivě, čtivě a přehledně, kapitoly týkající se přehledu miniaturizovaných extrakčních technik jsou vhodně doplněny obrázky, schematicky znázorňujícími jednotlivé mikroextrakční techniky, což čtenáři usnadňuje orientaci v této oblasti výzkumu. Text celé práce je doplněn velkým množstvím citací, celkově 223.

Cíle práce jsou jasně definovány.

V experimentální části se autorka zaměřila na shrnutí nejdůležitějších výsledků, získaných v bioanalytickém hodnocení strukturně blízkých analogů dexrazoxanu, za účelem zjistit, zda některé z nich by mohly vykazovat kardioprotektivní účinky vůči antracyklinem indukované kardiotoxicitě. Za tímto účelem byly syntetizovány dvě série nových, odlišně substituovaných analogů dexrazoxanu a jejich kardioprotektivní účinky byly studovány *in vitro* a v užším výběru i *in vivo*. Bohužel žádný z navržených analogů nevykazoval žádoucí efekt. Pro stanovení těchto nových analogů byla vyvinuta LC-MS/MS metoda za použití kolony Synergi Polar-RP, která je vhodná pro separaci látek i v čistě vodné mobilní fázi. Vyvinutá metoda byla validována pro analýzu analogů s relativně největším inhibičním potenciálem, a to GK-627 a GK-580 a jejich metabolitů v králičí plazmě. Ani jeden z nich však nevykazoval interakci s TOP2B, jež se zdá být klíčová pro kardioprotektivní potenciál látek. Dalším analogem, blízkým dexrazoxanu, byla látka ICRF-154, která je však ve vodě velmi špatně rozpustná, a proto je v klinické praxi používáno její proléčivo sobuzoxan. Obě tyto látky vykazují inhibici vůči TOP2B a byl studován jejich protektivní efekt vůči antracyklinem indukované toxicitě. Pro sledování metabolismu sobuzoxanu *in vitro* byla vyvinuta UHPLC-MS/MS metoda a bylo testováno několik typů stacionárních fází s ohledem na rozdílnou polaritu stanovovaných látek a nízkou stabilitu sobuzoxanu v biologických maticích. Další výzkum byl zaměřen na slibnou látku ICRF-193, avšak opět špatně rozpustnou ve vodě a další testy byly prováděny se třemi nově syntetizovanými analogy této látky s podstatně vyšší rozpustností. Pro jejich sledování byla opět vyvinuta UHPLC-MS/MS metoda a bylo vyzkoušeno několik stacionárních fází, řešících obdobné problémy separace jako v předchozích případech. Rozsáhlá studie ukázala, že nejslibnějším kandidátem pro další studie protektivního účinku je proléčivo GK-667. Získané výsledky byly publikovány ve třech pracích, uveřejněných v mezinárodních periodikách s vysokým impakt faktorem, spadající do skupiny Q1. Ve všech třech publikacích byla předkladatelka spoluautorem, z toho jednou jako první autor.

Důležitou součástí výzkumu bylo i sledovat, zda potenciální inhibitory kardiotoxicity, indukované antracyklinem, neovlivňují jeho farmakokinetiku. Z tohoto důvodu bylo nutné vyvinout vhodnou extrakční metodu pro jejich izolaci z králičí plazmy a bylo vyzkoušeno několik mikroextrakčních technik s cílem dosáhnout dostatečného zakoncentrování analytu a

současně dostatečného přečištění vzorku. Výsledná optimalizovaná mikroextrakční technika na bázi elektromembránové extrakce (EME) byla porovnána s konvenčními metodami (extrakce kapalina-kapalina, proteinová precipitace) a EME poskytovala nejvyšší výtěžnost a minimální matricové efekty. Získané výsledky byly publikovány ve vysoce impaktovaném časopisu *Talanta* s předkladatelkou jako prvním autorem.

K práci mám několik poznámek a dotazů:

V práci se vyskytuje několik překlepů či formálně nesprávně napsaných výrazů:

Str. 23 v peklinockých fázích místo v preklinických fázích

Str. 26 log P nebo pKa by proměnné měly být psány kurzívou stejně jako n v n-hexanu na str. 37

Str. 35 diethyl ether, dodecyl acetát, isopentyl benzen se česky píše dohromady

Str. 46 správně *tris*(2-ethylhexyl) fosfát

Str. 68 v této části textu se vyskytuje velké množství zkratk, což snižuje plynulost textu a čtenář musí zkratky dohledávat na začátku práce

Otázky do diskuse:

- 1) Proč byl pro proteinovou precipitaci použit methanol a ne acetonitril, který je běžněji užívaný? (str. 62)
- 2) Neuvažovali jste o vyzkoušení stacionárních fází s deklarovaným sníženým obsahem kovů v silikagelu, které snižují možnost komplexace s analytem? (str. 64)
- 3) Co způsobuje vyšší rozpustnost sobuzoxanu oproti analogu ICRF-154? (str. 64)
- 4) Byla koncentrace mravenčí kyseliny optimalizována? Koncentrace 0,025% je velmi nízká, zvláště v gradientu pouze s acetonitrem? (str. 69)

Předkládaná práce je na vysoké úrovni. Předkladatelka získala velké množství experimentálních dat, které pak zpracovala ve formě čtyř obsáhlých publikací, uveřejněných v časopisech z oblasti Q1. K práci nemám výhrady, a proto ji plně doporučuji k dalšímu řízení.

V Praze 30. 4. 2021

prof., RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.