

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a kontroly liečiv

Kandidát Mgr. Ján Stariat

Školiteľ Prof. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

Názov dizertačnej práce Analytické hodnotenie liečiv a potenciálnych liečiv zo skupiny látok chelatujúcich železo

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) má v analýze liečiv dominantné postavenie, pretože patrí medzi robustné techniky, umožňujúce dosiahnutie účinnej separácie väčšiny analytov prítomných vo vzorku, a zároveň ich kvalitatívne aj kvantitatívne hodnotenie. Pokroky vo vývoji stacionárnych fáz a detekčných techník umožňujú výrazne skrátiť čas analýzy, a zároveň získať celé spektrum informácií o povahe analytov prítomných vo vzorkách aj vo veľmi nízkych koncentráciách.

Nádorové ochorenia sa stále radia medzi významné príčiny smrti, z čoho vyplýva požiadavka na vývoj nových liečebných postupov. Stratégia založená na chelatácii železa vnútri nádorových buniek by mohla výraznou mierou prispieť k zlepšeniu prognózy u pacientov s tumormi rezistentnými voči štandardnej chemoterapii. Tento mechanizmus antiproliferatívneho pôsobenia je aktívne rozvíjaný u novej skupiny potenciálnych liečiv štruktúrne odvodených od thiosemikarbazonu, u ktorých bol cytostatický účinok pozorovaný *in vitro* aj *in vivo*. Ďalší pokrok v tejto oblasti je výraznou mierou závislý na dostupnosti vhodných bioanalytických metód pre hodnotenie týchto potenciálnych liečiv v biologickom materiáli.

Princíp chelatácie železa je taktiež spomínaný aj v prípade mechanizmu účinku dexrazoxanu – jediného klinicky dostupného kardioprotektíva schopného chrániť myokard pred toxickými účinkami antracyklinov. Tento princíp však doposiaľ nebol jednoznačne potvrdený, čo je do istej miery spôsobené nedostupnosťou bioanalytickej metódy schopnej hodnotenia tohto liečiva a jeho aktívnych metabolitov v mieste jeho pôsobenia – v srdečnom tkanive.

Prvý tematický celok tejto dizertačnej práce bol zameraný na analytické hodnotenie chelátorov železa odvodených od thiosemikarbazonu. V úvodnej fáze boli vyvinuté a validované HPLC-UV metódy pre hodnotenie *in vitro* stability u 2-hydroxy-1-naftylaldehyd-4-methyl-3-thiosemikarbazonu (N4mT) a di(2-pyridyl)keton-4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazonu (Dp44mT) v plazme, ktorá bola zároveň porovnaná so stabilitou pyridoxal-isonikotinoylhydrazonu (PIH) – materskej látky aroylhydrazonových chelátorov. Výsledky tejto práce poukázali na vyššiu stabilitu nových thiosemikarbazonov v porovnaní s ich aroylhydrazonovými predchodcami.

Následne bola vyvinutá a validovaná HPLC-MS/MS metóda schopná kvantifikácie *E/Z* izomérov 2-benzoylpyridin-4-ethyl-3-thiosemikarbazonu (Bp4eT). Metóda bola využitá v štúdiu rozpustnosti Bp4eT vo vodných rozpúšťadlách a farmaceutických kosolventoch, a súčasne bolo navrhnuté zloženie formulácie vhodné pre *i.v.* podanie tejto látky.

Vzápätí bol študovaný *in vitro* a *in vivo* metabolizmus 1. fáze u Bp4eT. Štruktúry dvoch metabolitov detegovaných v *in vitro* vzorkách boli navrhnuté na základe výsledkov HPLC-MS/MS experimentov, a následne potvrdené pomocou NMR a IČ spektrometrie. Oba oxidačné metabolity boli taktiež detegované *in vivo*, a zároveň tu bol identifikovaný nový

hydroxylovaný metabolický produkt.

Posledná práca prvého celku bola venovaná novo pripravenému thiosemikarbazonovému analógu - di(2-pyridyl)keton-4-methyl-4-cyklohexyl-3-thiosemikarbazonu (DpC), u ktorého bol detailne skúmaný *in vitro* metabolizmus 1. a 2. fáze pomocou UPLC-QTOF metódy. Štruktúry metabolitov boli spočiatku navrhnuté na základe dát získaných analýzou s vysokým rozlíšením a presným určením hmoty a vzápätí potvrdené pomocou štúdia ich fragmentácie. Spolu bolo detegovaných 10 metabolitov 1. fáze medzi ktoré patrili produkty oxidácie thiokarbonylovej skupiny, *N*-demethylácie, hydroxylácie, otvorenia cyklohexylu spojeného s adíciou vody, a zároveň rôzne kombinácie týchto reakcií. V prípade konjugačných metabolitov boli detegované dva glukuronidy, zatiaľ čo sulfáty a konjugáty s glutathionom neboli objavené.

Náplňou druhého celku bolo štúdium možnosti separácie a popisu mechanizmu retencie u dexrazoxanu a jeho metabolitov v HILIC móde za podmienok kompatibilných s hmotnostnou detekciou. Separácia všetkých analytov bola dosiahnutá iba na kolóne so stacionárnou fázou na báze zwitterionov. Výsledky tejto práce taktiež potvrdzujú prítomnosť komplexného mechanizmu retencie v HILIC móde, v ktorom sa môže uplatniť adsorpcia, rozdeľovanie a iónová interakcia.