

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE
A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY

DISERTAČNÍ PRÁCE

(Soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

Analytické a bioanalytické hodnocení nových potencionálních
léčiv ze skupiny chelátorů železa

Kandidát: Mgr. Jan Bureš

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

Hradec Králové 2018

Prohlášení

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

V Hradci Králové, dne 25.2.2018

.....
Mgr. Jan Bureš

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval mé školitelce doc. PharmDr. Petře Štěrbové, Ph.D. za prvotřídní odborné vedení, pomoc a obrovskou dávku trpělivosti po celou dobu mého doktorského studia.

Dále bych rád poděkoval spoluautorům předložených publikací za spolupráci a celému kolektivu Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za vytvoření příjemné a přátelské atmosféry k práci. Speciální dík patří PharmDr. Vítu Šestákovi, Ph.D. za každodenní společnost v laboratoři, pomoc při práci a smysl pro humor, který nám oběma pomohl dokončit postgraduální studium.

Na závěr děkuji svojí rodině, především Ing. Jitce Novotové, Ph.D. za morální a psychickou podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

Tato práce byla vytvořena za podpory grantů Univerzity Karlovy v Praze (projekty SVV 265001, SVV 267001, SVV 260062, SVV 260183, SVV 260291), Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekty GAUK 367911, GAUK 903113, GAUK 1324214) a Grantové agentury České republiky (projekt GACR 13-15008S).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Mgr. Jan Bureš

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

Název práce: Analytické a bioanalytické hodnocení nových potenciálních léčiv ze skupiny chelátorů železa

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) díky svým kvalitám získala důležitou pozici v analýze léčiv v biologickém materiálu. Umožňuje za vhodně zvolených podmínek separovat téměř jakoukoliv směs látek, provádět kvalitativní i kvantitativní analýzu, a to obvykle ve velmi krátkém čase. Díky moderním stacionárním fázím a detekčním technikám lze detekovat i látky ve stopovém množství a v rámci jedné analýzy je možné kromě koncentrace získat i informace o struktuře analytů. Spolehlivost používaných HPLC metod je garantována jejich validací na základě přijatých norem.

Chelatace železa se jeví jako efektivní přístup v léčbě celé řady patologických stavů od přetížení organismu železem, přes rakovinu až po neurodegenerativní choroby. Pro vývoj chelátorů pro tyto indikace je však klíčové nejprve jasně charakterizovat jejich vlastnosti (vztah struktura-aktivita, metabolismus, toxicita atd.), k čemuž je mimo jiné zapotřebí i spolehlivých analytických metod.

V rámci této disertační práce byly vyvinuty a validovány LC-UV a LC-MS metody pro analýzu aroylhydrazonových chelátorů železa a jejich vybraných proléčiv v relevantním biologickém materiálu. Během práce byl studován vztah struktura-aktivita v této skupině látek. Jako nejvýhodnější se na základě sledovaných parametrů (především stabilita a selektivita účinku látek) ukázala substituce vodíku v blízkosti hydrazonové vazby alkylem. LC-UV metoda byla v této fázi využita především při hodnocení vlivu jednotlivých strukturních modifikací na stabilitu látek v plasmě.

Dále byla pozornost zaměřena na hodnocení potenciálních proléčiv, která by umožnila zacílení účinku vlastních aktivních látek a omezení systémové toxicity. Pro studium aktivace a stability vybraných prochelátorů byly použity LC-UV/MS metody. Bylo zjištěno, že prochelátor BSIH vykazuje vyšší stabilitu v porovnání se SIH *in vitro* a má také delší

biologický poločas *in vivo*. Dále byla prokázána jeho relativně nízká toxicita a dobrá cytoprotektivní účinnost proti peroxidu vodíku. Při aktivaci se BSIH rozkládá na aktivní SIH, ale ve větším množství také na salicylaldehyd, který však přispívá k celkovému protektivnímu účinku.

Druhým studovaným prochelátorem byl BHAPI, odvozený od aroylhydrazonu s vylepšenou stabilitou (oproti předlohovému SIH) – HAPI. S využitím LC-UV bylo zjištěno, že je proléčivo aktivováno katecholaminy na HAPI v ekvimolárním množství. Jak HAPI, tak BHAPI (po aktivaci) snižovaly cytotoxický účinek katecholaminů a jejich oxidačních produktů. Z výsledků těchto studií vyplývá, že koncept prochelátorů je velice slibný směr v budoucím vývoji aroylhydrazonových léčiv.

S využitím LC-MS byl systematicky hodnocen metabolismus a farmakokinetika kardioprotektivního léčiva dexrazoxanu (DEX) a jeho metabolitu ADR-925. Byly analyzovány biologické vzorky odebrané jak z *in vitro*, tak *in vivo* experimentů. Získaná data byla zpracována v populační studii a farmakokinetické parametry přibližně odpovídají hodnotám z klinických studií. Práce zpochybňuje dosud uznávaný mechanismus účinku DEX, zprostředkovaný chelatujícím metabolitem, který má snižovat produkci kyslíkových radikálů (ROS). Získaná data naopak podporují nejnovější teorii mechanismu kardioprotekce DEX – depleci topoizomerázy 2 β (TOP2B) parentní látkou.

Poslední část práce byla zaměřena na nový analog DEX – JR-311, který byl připraven záměnou methylové skupiny ve spojovacím řetězci za oxo- skupinu. Pro detailní studium jeho stability, metabolismu a průniku do srdečních buněk byla vyvinuta nová LC-MS metoda. Bylo zjištěno, že JR-311 je *in vitro* rychle degradován, což poukázalo na nutnost změny designu experimentů. JR-311 vykázal jednak schopnost deplece TOP2B, ale také kardioprotektivní účinek vůči toxickému působení daunorubicinu (DAU). Výsledky studie prokázaly, že uvedená strukturní modifikace nevede ke ztrátě účinku, avšak pro další vývoj těchto látek je nutné zlepšit stabilitu nových analogů. Kromě toho práce naznačuje významnou roli TOP2 v kardioprotekci bisdioxopiperazinů.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Mgr. Jan Bureš
Supervisor: Doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.
Title of Thesis: Analytical and bioanalytical evaluation of novel potential drugs from the group of iron chelators

High performance liquid chromatography (HPLC) gained its unprecedented position among bioanalytical techniques due to its effectivity and versatility. If tuned properly, it can separate complex mixtures and can be used for qualitative and quantitative analysis simultaneously, usually within a short time. Reliability of the HPLC methods is proven by their validation performed according to accepted guidelines.

Iron chelation is considered to be an effective concept of treatment of various pathologies – from iron overload disease to cancer or neurodegenerative disorders. To develop new chelators for these indications it is important to investigate their structure-activity relationship, the fate of the drug in organism and its relationship to biological effects and toxicity etc. Modern analytical methods are essential tools for these studies.

The first part of this work presents validated LC-UV and LC-MS methods for assay of aroylhydrazone iron chelators and related pro-drugs in biological materials. In the study, the structure-activity relationship in the group of the aroylhydrazones was examined. We proved that alkyl substitution of hydrogen in the vicinity of the hydrazone moiety is key in enhancing their chemical stability due to steric hindrance of the hydrazone bond.

Additionally, utilising developed analytical methods, we proved in further experiments that: 1) an oxidation-activated prodrug BSIH is more stable *in vitro* and has better pharmacokinetic properties *in vivo* than its active form SIH, 2) BSIH is less toxic and protects cells from hydrogen peroxide induced damage, 3) BSIH decomposes to SIH but also to salicylaldehyde which augments the protective effect of the drug.

The next study was focused on the prochelator BHAPI, based on aroylhydrazone with improved stability in plasma (compared to SIH) – HAPI. The study proved that the prochelator is equimolarly activated to HAPI and both BHAPI and its active form reduce

the toxicity induced by catecholamines and their oxidative products. These results show the concept of boronated prodrugs to be a promising approach for development of new effective chelating therapeutics.

The second part of this work deals with systematic assessment of metabolism and pharmacokinetics of the cardioprotective drug dexrazoxane (DEX) and its metabolite (ADR-925). A validated LC-MS method was utilised in this study to analyse samples from both *in vitro* and *in vivo* experiments. Recorded data were processed in population study. Our results show that the experimental model utilising rabbits for cardioprotection studies provides high similarity in pharmacokinetics to clinical models. This work challenges the hypothesis that the cardioprotective effect of DEX is caused by its iron chelating metabolite – ADR-925, which should hamper Fenton chemistry in the heart. In addition, the current data corroborate the modern theory that parent compound DEX may protect the heart from anthracycline induced cardiotoxicity via inhibition of topoisomerase 2 β .

This new hypothesis is also augmented by the last paper included in this dissertation. It is focused on a DEX analogue JR-311 (where one methyl group was replaced by an oxo-group). New LC-MS method was developed to investigate stability, metabolism and penetration to cardiomyocytes of JR-311. The study revealed that JR-311 is quickly hydrolysed to an ADR-925-like compound – which leads to a complete loss of its protective effect. This finding pointed at the need for significant modification of design of *in vitro* experiments. The modified *in vitro* study showed that JR-311 interacts with TOP2B as well as it protects the heart cells from anthracycline induced damage. Study showed that the presented structural modification does not hamper the activity of JR-311, but future development should be focused on more stable DEX analogues.

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. CÍL PRÁCE.....	14
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	16
3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	17
3.1.1 Instrumentace HPLC	17
3.1.2 Současné trendy v HPLC analýze léčiv	27
3.1.3 Vyhodnocení získaných dat	29
3.2 Úprava vzorků před HPLC analýzou	32
3.2.1 Biologické vzorky	32
3.2.2 Základní metody úpravy vzorků.....	33
3.3 Validace bioanalytických metod	37
3.3.1 Význam validace metody	37
3.3.2 Validační parametry	38
3.4 Chelátory železa	43
3.4.1 Železo v lidském organismu	43
3.4.2 Chelatační terapie	44
3.4.3 Aroylhydrazonové chelátory	46
3.5 Dexrazoxan jako kardioprotektivum v protinádorové léčbě.....	52
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	55
4.1 Analytické hodnocení nových aroylhydrazonů a jejich proléčiv v biologickém materiálu.....	56
4.2 Analytické hodnocení dexrazoxanu a jeho analogů.....	63
4.3 Publikační činnost	68
4.3.1 Publikace zahrnuté v disertační práci.....	68
4.3.2 Publikace nezahrnuté v disertační práci	71
5. ZÁVĚR.....	72
6. PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONFERENCÍCH	75
6.1 Přednášky	75
6.2 Postery.....	75
7. ÚČAST V GRANTOVÝCH PROJEKTECH.....	77
7.1 Hlavní řešitel	77

7.2 Člen řešitelského týmu	77
8. ABSOLVOVANÉ STÁŽE	78
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	79
10. PŘÍLOHY	87
10.1 Příloha číslo 1	88
10.2 Příloha číslo 2.....	108
10.3 Příloha číslo 3	130
10.4 Příloha číslo 4.....	142
10.5 Příloha číslo 5.....	156
10.6 Příloha číslo 6.....	172

1. ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High performance liquid chromatography) patří mezi nezastupitelné nástroje jak při výzkumu a vývoji nových léčiv, tak v klinické praxi. Široké uplatnění v současné době nalézá prakticky v celém životním cyklu léčiva. Hojně se používá především při strukturní analýze nových účinných látek, jejich nečistot a rozkladných produktů, při stabilitních a farmakokinetických studiích. Dále se tato technika využívá při hodnocení lékových forem, ale je také nedocenitelná v terapeutickém monitorování lékových hladin nebo toxikologické analýze. Náročné farmakokineticko-farmakodynamické studie umožňují s využitím kapalinové chromatografie (především ve spojení s hmotnostním spektrometrem) odhalovat klíčové strukturní prvky molekul zodpovědné za jejich účinek, toxicitu a metabolickou stabilitu. Díky těmto poznatkům je následně možné cíleně vyvíjet nová léčiva, která jsou bezpečnější, účinnější nebo mají výhodnější farmakokinetické parametry. HPLC umožňuje separaci mnoha látek obsažených i ve velmi komplikovaném vzorku a současně jejich kvalitativní a kvantitativní hodnocení, a to v poměrně krátkém čase.

Látky typu biokompatibilních chelátorů našly v předchozích letech uplatnění především v léčbě přetížení organismu železem. S rostoucím poznáním se však ukázalo, že narušení homeostázy železa v lidském organismu má větší či menší vliv i na rozvoj celé řady dalších patologických stavů (například nádorové a neurodegenerativní onemocnění – Alzheimerova a Parkinsonova choroba, ischemicko-reperfúzní poškození tkání atd.). Mimo jiné vykazují chelátory železa do značné míry také antimikrobiální potenciál. Široké spektrum jejich možného využití z nich dělá velice zajímavou skupinu pro vývoj nových léčiv.

Jednou z nadějných a v současné době intenzivně studovaných skupin jsou aroylhydrazonové chelátory železa, které by mohly najít využití právě v těchto nových aplikacích. Pilotní látkou této skupiny se stal pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH), na jehož základě byla syntetizována řada dalších analogů. Mezi nejzajímavější patří salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH). SIH je málo toxická lipofilní malá molekula, která dokáže dobře procházet biologickými membránami. Tento fakt souvisí s jeho klíčovou výhodou – na rozdíl od řady jiných aroylhydrazonů je možné podávat jej perorálně. Zásadní komplikací je však jeho nízká stabilita v biologickém materiálu a krátký biologický poločas.

Jednou z možností, jak zlepšit chemickou stabilitu SIH, je modifikace struktury s cílem zvýšit stabilitu hydrazonové vazby. Nově připravený analog (*E*)-*N'*-(1-(2-hydroxyfenyl) ethylen) isonikotinohydrazid (HAPI) je významně stabilnější v porovnání se SIH, a to bez ztráty biologického účinku. Další možností, jak modifikovat vlastnosti SIH, je příprava proléčiv, která by byla odolnější vůči rozkladu v biologickém materiálu a která by

byla aktivována až v místě účinku (např. oxidačním stresem). Koncept proléčiva přináší možnost přesného zacílení účinku do postižených tkání, což minimalizuje rizika spojená s deplecí železa v celém organismu. Jako proléčiva SIH a HAPI byly připraveny následující látky: boronyl salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (BSIH) a (*E*)-*N*'-(1-(2-((4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,2,3-dioxoborolan-2-yl)benzyl) oxy) fenyl) ethyliden) isonikotinohydrazid (BHAPI), které byly studovány z pohledu jejich aktivace.

Chelatační teorie byla dlouhou dobu spojována také s mechanismem účinku dexrazoxanu (DEX), v současné době jediného klinicky používaného léčiva určeného k ochraně srdce před toxickým působením anthracyklinových cytostatik. Kardioprotektivní působení bylo mnoho let přisuzováno hydrofilnímu metabolitu parentní látky – ADR-925, který je schopný vázat volné ionty železa. S novými fakty však byla tato teorie zpochybněna a současný stav poznání naznačuje, že klíčovým elementem může být deplece topoizomerázy II β (TOP2B). Absence přesných informací o kardioprotektivním působení DEX komplikuje studium vztahu struktura-kardioprotektivní účinek a také vývoj nových potenciálně účinnějších analogů DEX. Jedním z možných nástrojů pro objasnění mechanismu kardioprotekce DEX je studium jeho farmakokinetiky a především její korelace s farmakodynamikou. K tomu je však nezbytná spolehlivá analytická metoda umožňující stanovit parentní látku a současně její hydrofilní metabolit v relevantním biologickém materiálu. Taková metoda je také základem pro optimalizaci podmínek při analýze nově syntetizovaných analogů DEX.

Tato disertační práce popisuje ve své teoretické části principy HPLC, funkci jednotlivých modulů v chromatografické sestavě, metody vyhodnocení chromatografického záznamu a vybrané trendy v této oblasti. V práci je dále popsána validace analytických metod a také principy úpravy biologických vzorků.

V další části je pojednáno o významu železa a jeho metabolismu v lidském organismu, o principu chelatační terapie a jsou zde charakterizovány aroylhydrazonové chelátory železa, které byly v rámci této práce studovány. Poslední část je pak zaměřena na DEX a jeho vybrané analogy.

Experimentální část této disertační práce je tvořena komentářem k šesti vědeckým pracím, publikovaným v zahraničních časopisech s impakt faktorem. První blok se zabývá HPLC analýzou vybraných aroylhydrazonových chelátorů železa v biologickém materiálu s cílem studovat jejich stabilitu v plasmě *in vitro* a porovnat ji se SIH. Dále byly vyvinuty a

validovány nové LC-UV a LC-MS metody pro stanovení dvou proléčiv aroylhydrazonů – BSIH a BHAPI. S jejich využitím jsme potvrdili, že nově syntetizovaný prochelátor BSIH je v porovnání s předlohou látkou (SIH) stabilnější, má delší biologický poločas a je aktivován až oxidačním stresem (např. peroxidem vodíku). Pomocí LC-UV metody jsme studovali také aktivaci BHAPI *in vitro* a zjistili, že na rozdíl od BSIH se BHAPI přeměňuje na svou aktivní formu v ekvimolárním množství, což je výhodné z pohledu jeho dalšího vývoje jako potenciálního léčiva.

Druhý blok experimentální části je zaměřen na LC-MS analýzu DEX a ADR-925 v různém biologickém materiálu. Byla validována LC-MS/MS metoda umožňující kvantifikaci obou látek v plasmě, moči, myokardu, izolovaných srdečních buňkách a buněčném médium. Metoda byla použita pro analýzu vzorků z *in vitro* experimentů zaměřených na studium aktivace DEX v srdečních buňkách a také vzorků z komplexní farmakokinetické studie u králíka. V poslední části práce je pozornost zaměřena na vývoj a validaci LC-MS/MS metody pro stanovení nového analogu DEX – JR-311 (liší se náhradou methylu ve spojovacím řetězci molekuly za oxo- skupinu). Aplikace metody při analýze vzorků z *in vitro* experimentů umožnila zjistit, že absence kardioprotekce a TOP2B inhibice pozorovaná za použití standardního experimentálního protokolu je způsobena rychlým rozkladem JR-311. Na základě těchto dat byl upraven protokol *in vitro* experimentů a bylo prokázáno, že JR-311 je schopen depletovat TOP2B a chránit buňky před toxickým působením anthracyklinů. Práce vyzdvihuje důležitost multidisciplinárního přístupu při hodnocení nových potenciálních léčiv.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo vyvinout LC-UV a LC-MS/MS analytické metody a prakticky je využít při hodnocení nových potenciálních léčiv za účelem studia jejich bioaktivace, stability, metabolismu a farmakokinetiky. Práce je členěna na dva tematické bloky. První pojednává o analýze aroylhydrazonových chelátorů železa, včetně jejich proléčiv. Druhý blok se zabývá analýzou dexrazoxanu, jeho metabolitu ADR-925 a vybraných analogů.

Dílčí cíle prvního tematického bloku

- 1) S použitím validované LC-UV metody provést hodnocení stability řady aroylhydrazonových analogů SIH v králičí plasmě *in vitro*.
- 2) Vyvinout a validovat LC-UV metodu pro stanovení SIH a jeho proléčiva BSIH v pufru, buněčném médiu a králičí plasmě a použít ji při studiu aktivace a stability proléčiva *in vitro*.
- 3) Pomocí validované LC-MS/MS metody hodnotit stabilitu SIH a BSIH v plasmě a stanovit základní farmakokinetické parametry BSIH u potkana.
- 4) Upravit vyvinutou LC-UV metodu a použít ji ke stanovení rozkladných produktů SIH a BSIH *in vitro* během studia jejich degradace.
- 5) Vyvinout a validovat LC-UV metodu pro hodnocení HAPI a jeho proléčiva BHAPI a využít ji při studiu aktivace působením katecholaminů.

Dílčí cíle druhého tematického bloku

- 1) S využitím LC-MS/MS metody studovat *in vitro* stabilitu a penetraci do buněk jak parentní látky – DEX, tak i jeho metabolitu ADR-925.
- 2) Provést analýzu biologických vzorků (plasma, moč, tkáň) z rozsáhlé *in vivo* studie po aplikaci DEX i ADR-925 králíkům a přispět tak k objasnění reálného významu metabolismu těchto látek pro jejich kardioprotektivní účinek.
- 3) Vyvinout a validovat LC-MS/MS metodu pro hodnocení nového analogu DEX – JR-311 a jeho metabolitů v biologickém materiálu.
- 4) Metodu použít pro analýzu vzorků z *in vitro* studie zaměřené na studium stability, aktivace a průniku JR-311 do srdečních buněk a porovnáním výsledků s DEX přispět k objasnění mechanismu kardioprotekce a vztahu struktura-aktivita v této skupině léčiv.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography – HPLC)

Chromatografie je fyzikálně-chemická separační metoda, která umožňuje rozdělení jednotlivých složek i ve velice komplikovaném vzorku. Klasická sloupcová chromatografie je historickým předchůdcem, který umožnil vývoj jedné z dnes nejpoužívanějších analytických metod – vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) [1-3].

Podstatou této metody je rozdělování jednotlivých látek v analyzované směsi mezi dvě fáze – stacionární a mobilní. Mobilní fáze unáší jednotlivé složky analyzované směsi různou rychlostí v závislosti na jejich interakci s oběma fázemi. Čím silněji jsou tyto složky zadržovány stacionární fází, tím pomaleji se v systému pohybují [1, 2].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie patří mezi základní techniky dnes rutinně využívané ve farmaceutické analýze. Vzhledem ke své rychlosti, efektivitě, možnosti kvalitativního i kvantitativního hodnocení analytů i díky možnosti snadného uchování a sdílení získaných dat nachází využití v široké škále aplikací. Své uplatnění najde při identifikaci léčiv a jejich metabolitů, při hodnocení kvality farmaceutických substancí a během stabilitních a farmakokinetických studií. V neposlední řadě je používána také v rámci terapeutického monitorování lékových hladin nebo toxikologické analýzy. Mimo to je nepostradatelným nástrojem v řadě příbuzných oborů, jako je enviromentální nebo forenzní analýza. Je tedy zřejmé, že se jedná o velmi univerzální a oblíbenou metodu s vynikajícím poměrem mezi kvalitou získaných informací a náročností [1, 4, 5].

3.1.1 Instrumentace HPLC

Zásobníky mobilní fáze

HPLC sestava obsahuje ve většině případů dva zásobníky. V každém z nich se nachází složka mobilní fáze o různé eluční síle. To umožňuje měnit během analýzy složení mobilní fáze [6, 7].

Čerpadlo

Pumpy zajišťují tok mobilní fáze HPLC sestavou. Zásadním požadavkem je udržení konstantní průtokové rychlosti, a to při tlaku v řádu až desítek megapascalů (MPa). Při dnešních nárocích na chromatografický systém jsou obvykle používána dvojčinná čerpadla,

čerpadla využívající více pístů (ty pak pumpují recipročně), případně jiné alternativy umožňující udržení konstantního toku (tlaku). Nejčastěji jsou zhotoveny z oceli nebo keramiky [8, 9].

Degasser

Při nasátí ze zásobníku obsahuje mobilní fáze relativně velké množství plynů, které je před vlastní analýzou třeba odstranit. Jejich přítomnost způsobuje kolísání tlaků v systému a šum základní linie, což zhoršuje citlivost a opakovatelnost stanovení a separační účinnost celého procesu. Současné chromatografické sestavy využívají k odstranění plynů z mobilní fáze tzv. degasser. Jedná se o zařízení, které je tvořeno semipermeabilní trubicí, skrze niž proudí mobilní fáze. Velikost pórů umožňuje průchod pouze plynům a tento proces je urychlen podtlakem generovaným v okolí trubice [7, 8].

Směšovací zařízení

Využívá-li HPLC systém více zásobníků mobilní fáze, je třeba jednotlivé složky efektivně míchat dle přednastaveného programu. Směšovací zařízení umožňuje během celé analýzy udržet konstantní složení mobilní fáze (isokratická eluce) nebo ho automaticky měnit dle programu zadaného operátorem (gradientová eluce) [2, 8, 9].

Dávkovací zařízení

Vzhledem k nárokům na automatizace metod se dnes používají téměř výhradně automatické dávkovače s vícecestnými ventily. Oproti dávno překonanému dávkování injekční stříkačkou umožňují přesné dávkování vzorků bez zastavení toku mobilní fáze dle předem zadaného programu. S tím souvisí možnost analýzy velkého množství vzorků v plně automatickém režimu. V takovém případě je obvykle série vzorků umístěna v tzv. autosampleru, který je termostatovaný a vzorky jsou odebírány přístrojem dle nastaveného programu [7, 8].

Chromatografická kolona

Kolona je trubice v dnešní době vyrobená nejčastěji z nerezové oceli, případně z plastu. Separační účinnost chromatografické kolony je ovlivněna řadou parametrů. Patří mezi ně délka a vnitřní průměr kolony, velikost částic (účinná plocha sorbentu), homogenita náplně atd. Dnešní trh nabízí široké množství kolon lišících se délkou, průměrem a především vnitřním obsahem (stacionární fází) [2, 7, 10].

Kolony oddělují od ostatních součástí systému kapilární spoje za účelem udržení minimálního mrtvého objemu. Kolony jsou u moderních přístrojů umístěny v prostoru vybaveném termostatem. Volba vyšší teploty snižuje viskozitu mobilní fáze a tedy i zpětný tlak, je ale nutné myslet na stabilitu analyzovaných látek [1, 2].

Rozlišujeme celou řadu typů kolon:

Náplňové kolony

Jejich délka se pohybuje většinou v rozmezí 50-250 mm a vnitřní průměr (internal diameter – ID) 2,1-4,6 mm. Náplň jsou sférické částice o průměru 3-5 μm . Kolony dosahující horní hranice zmíněných parametrů (250 mm, ID 4,6 mm, částice 5 μm) se však v současné době používají pouze omezeně. V případě vysokotlakých systémů (ultra high performance liquid chromatography – UHPLC) může být velikost částic i menší – až 1,3 μm . Se zmenšujícím se průměrem částic roste celkový povrch sorbentu, což zlepšuje účinnost separace. Zároveň je však nutné k udržení proudění mobilní fáze vyvinout výrazně vyšší tlaky, což vyžaduje použití instrumentace odolné vůči těmto vysokým tlakům. Další možností, jak zvýšit účinnost separace, je pak použití chromatografických kolon plněných sorbenty s částicemi s tuhým jádrem (tzv. core-shell). Celková velikost částic je zachována, mobilní fáze však nemůže pronikat do pevného jádra částice, díky čemuž je generován nižší zpětný tlak. Menší difuzní dráha tak zužuje získané píky a zlepšuje separační účinnost. V porovnání s běžnými kolonami ale mají nižší kapacitu [1, 2, 10, 11].

K vlastní separaci analytů lze použít kolony naplněné nosiči s různými stacionárními fázemi. Jako normální fáze může být použit silikagel, jehož silanolové skupiny mají polární charakter. Silanolové skupiny je možné modifikovat řadou jiných polárních skupin (amino, kyano atd.) za účelem ovlivnění selektivity stacionární fáze. V dnešní době jsou však mnohem častěji používány nepolární, tzv. reverzní fáze. V jejich případě je silikagel modifikován pomocí nepolárních skupin (např. oktadecylové, pentafluorofenylové, fenylhexylové řetězce atd.). Polaritu je dále možno upravovat pomocí polárnějších skupin za účelem změny selektivity při separaci. Dále lze použít stacionární fáze na bázi měničů iontů (iontově-výměnná chromatografie), vysoce selektivních interakcí (afinitní chromatografie) nebo chirálních interakcí [9, 10, 12, 13].

Kapilární kolony

Jedná se o tenkou kapiláru s vnitřním průměrem v řádu stovek μm . Mohou být použity kolony s náplní v řádu jednotek μm , případně plní funkci sorbentu pouze povrch kapiláry. Jejich rutinní využití v dnešní HPLC je však zanedbatelné [7, 14].

Monolitické kolony

Náplň monolitických kolon je tvořena jedním kusem sorbentu, který vzniká již při výrobě polymerizací přímo uvnitř kolony. Tyto bloky obsahují velké množství pórů. Velké póry (makropóry, 8 μm) umožňují rychlý tok mobilní fáze a střední póry (mesopóry, 10-12 nm) zvyšují povrch sorbentu a dávají mu dostatečnou separační kapacitu. Monolitické kolony umožňují použití vyšších průtoků, s čímž souvisí zkrácení analýzy, ale také zvýšení spotřeby mobilní fáze, z níž především organická složka zatěžuje životní prostředí [7, 15-17].

V případě analýzy vysoce hydrofilních látek může být vhodné použití kolony v HILIC režimu, kdy je hydrofilní látka podstatně lépe zadržena. V porovnání se separací na reverzních fázích dojde k otočení pořadí při eluci analytů. Zásadní výhodou tohoto postupu je fakt, že hydrofilní analyt není eluován v čele chromatogramu s balasty z biologické matrice, které mohou narušit reprodukovatelnost metody, případně negativně ovlivnit detekční a kvantifikační limity metody [18-21].

Specifické požadavky jsou obecně kladeny na stacionární fáze v případě současné analýzy látek rozdílné polaritoy. V takovém případě je vhodné použít kolonu se stacionární fází, která umožňuje snížení rozdílu retenčních časů látek s různou polaritou. Tou může být například kolona Zorbax Bonus-RP (Agilent Technologies) s amidem zabudovaným v čtrnáctiuhlíkovém řetězci. Další možností je použití vícemodálních (mixed-mode) kolon, na nichž analyzované látky interagují se stacionární fází více než jedním interakčním mechanismem (např. interakce s reverzní fází a iontoměničem). Příkladem mohou být kolony Acclaim Trinity nebo Acclaim Mixed Mode (Thermo Fisher Scientific). Snížit rozdíl mezi retenčními časy analyzovaných látek lze však také volbou vhodného gradientu mobilní fáze [22-24].

Mezi problematické analyty patří při HPLC analýze i látky typu chelátorů (např. chelátory železa). Tyto látky jsou velmi citlivé na přítomnost iontů kovů, vytváří s nimi komplexy a dochází k celkovému narušení analýzy (změna retenčního chování, změna detekovaného m/z atd.). V takovém případě můžeme získat nereprodukovatelné výsledky, sníženou citlivost metody nebo se nám chelatačně aktivní látku nepovede vůbec detekovat.

Ideálním řešením by bylo prostředí bez přítomnosti kovových iontů. V praxi se dostatečně osvědčilo promytí kolony před analýzou roztokem EDTA, případně malý přírůstek EDTA do mobilní fáze. Řešením při HPLC analýze chelátorů však může být i použití kolon plněných silikagelem typu C (Silica TYPE-C), který je charakteristický náhradou silanolových skupin Si-OH za nepolární skupiny Si-H, sférickými částicemi, speciálním teplotním zpracováním a nízkým obsahem kovů (<10 ppm) [25-27].

Detektory

K detekci je dnes možné použít řadu detektorů využívajících ke své funkci různé fyzikální principy. Změna sledované vlastnosti je převedena na elektrický signál a pomocí výpočetní techniky zaznamenána. Vhodný detektor vybíráme na základě fyzikálně-chemických vlastností analyzovaných látek. Ideální detektor by měl mít vysokou citlivost (dnes až pg/ml roztoku), rychlou a reprodukovatelnou odezvu na sledovanou veličinu, měl by být univerzální a poskytovat lineární odezvu v širokém koncentračním rozmezí. Dále by jeho odezva měla být nezávislá na teplotě a složení mobilní fáze, detektor by měl být spolehlivý a nejlépe také nedestruktivní (tj. zachovat analyzované látky v původním stavu). Ačkoliv jsou v praxi na detektor kladeny vysoké nároky, je vždy nutné volit kompromis mezi všemi jmenovanými požadavky [2, 7, 10].

Spektrofotometrické detektory

Jedná se v současné době o běžně používané detektory. Měří absorbanci eluátu po separaci na koloně. Kvantifikace vychází z Lambert-Beerova zákona. UV detektory pracují při vlnové délce elektromagnetického záření 190-400 nm, v menší míře se využívají VIS detektory operující s vlnovou délkou 400-800 nm. Za vlastní absorpci záření analytem je zodpovědná strukturní část molekuly zvaná chromofor. Spektrofotometrické detektory vynikají širokým lineárním rozsahem odezvy (až 10^4) a citlivostí v řádu 10^{-9} až 10^{-10} g/ml. V současné době jsou používány dvě skupiny [3, 9, 10]:

- První skupina spektrofotometrů využívá deuteriovou lampu jako zdroj polychromatického záření a pomocí monochromátoru je možné nastavit požadovanou vlnovou délku pro analýzu (nejčastěji hodnotu maxima absorpce analytu).
- Další spektrofotometrické detektory, tzv. DAD (Diode Array detector), využívají diodového pole k měření celého absorpčního spektra ve zvoleném rozsahu vlnových délek. Poskytují trojrozměrný záznam x-čas, y-vlnová délka, z-absorbance, který mimo

retenčního času píků poskytuje i základní kvalitativní informace o přítomných analytech. Získaného záznamu lze využít k určení optimální vlnové délky při analýze hodnocené látky. Dále je možné záznam použít pro hodnocení čistoty získaných píků [2, 8].

Hmotnostní detektory

Hmotnostní spektrometry jsou nejdražším typem detektorů, ale díky jejich vysoké citlivosti, selektivitě, universálnímu použití a možnosti provádět strukturní analýzu patří mezi nejperspektivnější detektory ve farmaceutické analýze a bioanalýze. Detekce je založena na principu separace iontů v závislosti na poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) [2, 3, 28, 29].

Po průchodu vzorku (v mobilní fázi) kolonou je v první řadě třeba odstranit mobilní fázi a ionizovat analyty, což je při spojení LC-MS prováděno za atmosférického tlaku. K tomuto účelu slouží iontový zdroj. Rozlišujeme několik základních typů, z nichž můžeme vybírat na základě fyzikálně-chemických vlastností analyzovaných látek – především polarity a molekulové hmotnosti [28, 29]:

- **Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionization – ESI):** Eluát je pomocí zmlžovacího plynu (dusík) rozptýlen a vystaven vysokému napětí. Nabitě kapky aerosolu se vlivem teploty postupně zmenšují, dochází k houstnutí náboje a nakonec k tzv. coulombické explozi a uvolnění nabitých molekul. Vznikají molekulové ionty $[M+H]^+$ v případě pozitivní ionizace a ionty $[M-H]^-$ při použití negativního módu. Dále mohou vznikat adukty typu $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$ (včetně aduktů s mobilní fází) v pozitivním nebo typu $[M+Cl]^-$ a $[M+CH_3COO]^-$ v negativním módu. Metoda je vhodná pro analýzu středně polárních až velmi polárních látek. ESI umožňuje ionizovat malé i velké molekuly (s molekulovou hmotností nad 10.000, např. biopolymery nebo vysokomolekulární syntetické polymery) [28, 29].
- **Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionization – APCI):** Taktéž APCI zachovává $[M+H]^+$, případně $[M-H]^-$, avšak v tomto případě obvykle nevznikají adukty. Eluát je rozprášen, vysušen a nabit pomocí koronového výboje. Dochází převážně k ionizaci molekul mobilní fáze, které následně předávají náboj molekulám analyzovaných látek. Metoda se využívá k analýze méně a středně polárních látek. V porovnání s ESI jde o mírně tvrdší techniku, při níž jsou ve spektru často pozorovány také fragmentové ionty a lze pracovat s vyššími průtoky mobilní fáze (včetně nepolární) [28, 29].
- **Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure photoionization – APPI):** Princip je velice podobný chemické ionizaci za atmosférického tlaku. Liší se

pouze zdrojem ionizace, kterým je v tomto případě UV záření. Energie UV záření stačí k ionizaci organických látek, ale ne složek mobilní fáze. Metoda se používá pro neutrální a nepolární látky [5, 28, 29].

Pro správnou funkci hmotnostního spektrometru je nutné zajistit přechod mezi oblastí atmosférického tlaku a vakua v oblasti za iontovým zdrojem. Vakuum je obvykle generováno s využitím dvou pump. Rotační pumpa vytváří nízké vakuum a turbomolekulární pumpa umožňuje dosáhnout vysokého vakua. Vlastní přechod mezi oblastmi s velmi odlišnými tlaky pak tvoří soustava přepážek s malými otvory, které na jednu stranu umožní průchod analyzovaných iontů, ale na stranu druhou dostatečně zpomalují vyrovnávání tlakových gradientů. Uvnitř spektrometru jsou ionty transportovány pomocí soustavy elektrod (iontových čoček). Vhodným nastavením napětí a geometrie této iontové optiky je možné do značné míry oddělit nenabitě částice, zvýhodnit při průchodu požadované ionty a zlepšit tak parametry analýzy (zvýšení citlivosti, redukce šumu atd.) [29].

Ionizované molekuly je nutné po průchodu iontovou optikou separovat dle rozdílného m/z . K tomu slouží hmotnostní analyzátoři. K dělení dochází působením magnetického nebo elektrického pole, případně rozdílnou dobou letu iontů ve vakuu (10^{-5} až 10^{-7} torru). Jednou ze základních charakteristik hmotnostního analyzátoři je jeho rozlišovací schopnost (rozlišení) a přesnost určení m/z . Vysoká rozlišovací schopnost tedy přístroji umožňuje přesně určit molekulovou hmotnost studované látky. Mezi základní typy analyzátoři patří [28, 30]:

- **Iontová past (Ion trap – IT):** Jedná se o prostor ohraničený prstencovou elektrodou a dvěma koncovými elektrodami. Na elektrody je přiváděno stejnosměrné a střídavé napětí, které udržuje molekuly ve vnitřním prostoru, případně je dle zadaného nastavení na základě určeného m/z vypouští na detektor. Mimo standardní 3D iontové pasti existuje také lineární iontová past, která uspořádáním připomíná trojitý kvadrupól. IT analyzátoři má nižší rozlišení a menší přesnost určení m/z , ale umožňuje snadné provedení MS^n a je vhodný pro studium struktury látek – např. identifikace neznámých metabolitů [28, 31].
- **Kvadrupólový analyzátoři (Quadrupole – Q):** Kvadrupól se skládá ze čtyř stejných tyčí většinou kruhového průřezu. Na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí na zbylé dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny čtyři tyče je superponováno také střídavé napětí. Ionty jsou dopraveny mezi tyče kvadrupólu a vhodné nastavení napětí následně umožňuje správnou oscilaci a průchod pouze zvolenému m/z . Obvykle se používají tři kvadrupóly zapojené sériově za sebou (QqQ), z nichž prostřední slouží jako

kolizní cela. Využití nachází kvadrupól především v kvantitativní analýze (např. farmakokinetické studie) hlavně díky skenovací rychlosti, která umožňuje současnou analýzu více látek najednou [28, 31].

- **Analyzátor doby letu (Time of flight – TOF):** Jedná se o pulzní analyzátor. Ionty jsou pulzem urychleny při vstupu do letové trubice. Různé ionty letí různou rychlostí v závislosti na jejich m/z , a mají tedy odlišný čas dopadu na detektor. Ionty s menší hodnotou m/z se pohybují rychleji. Při ionizaci však ionty se stejnou hodnotou m/z získávají různou kinetickou energii, což rozšiřuje získané píky, a značně tedy zhoršuje rozlišovací schopnost přístroje. To je možné kompenzovat pomocí iontového zrcadla (reflektronu), které umožňuje vyrovnat kinetické energie iontů se stejným m/z před vstupem do letové trubice. Analyzátor vyniká vysokou skenovací rychlostí a přesností určení hmoty. V praxi se velmi osvědčil hybridní analyzátor typu QqTOF, tedy kombinace kvadrupólu a analyzátoru doby letu, který umožňuje velmi přesné určení hmoty studované substance, a podává tedy velmi cenné informace pro určení struktury látky (zastoupení jednotlivých atomů v molekule). Využití nachází například při identifikaci metabolitů léčiv [28, 30-32].
- **Orbitrap:** Jedná se o nejnovější typ analyzátoru. Skládá se ze dvou elektrod – středové a vnější. Přivedené ionty se pohybují podél a okolo středové elektrody a indukují proud. Hmotnostní spektrum se získá po Fourierově transformaci signálu. Orbitrap kombinuje velmi dobrou přesnost určení m/z a rozlišení s přijatelnými pořizovacími náklady. Využití nachází především ve strukturní analýze, a to hlavně v kombinaci s lineární iontovou pastí [28].
- **Iontová cyklotronová rezonance (Ion cyclotron resonance – ICR):** Ionty se v silném magnetickém poli (cca 7 tesla) pohybují po cykloidální trajektorii se specifickou cyklotronovou frekvencí. Detekce spočívá v měření indukovaného proudu na detekčních deskách. Díky Fourierově transformaci je možné přepočíst získané hodnoty a převést je do spektra m/z . ICR výrazně překonává všechny ostatní analyzátory vynikající přesností určení hmoty a rozlišením. Jeho zásadní nevýhodou je však obrovská cena, složitý provoz a pomalá skenovací rychlost, proto je v porovnání s předchozími analyzátory využívány méně [28].

Moderní přístroje, tzv. hybridní, někdy využívají také kombinace principů různých analyzátorů a vhodně spojují jejich výhody [28].

Posledním krokem v analýze je pak detekce dopadajících iontů a převedení informace do analytického softwaru v PC. Jako detektor se používá např. elektronový násobič nebo fotonásobič [28].

Pro získání požadovaných informací můžeme při práci s hmotnostním spektrometrem využít několika typů skenů (skenovacích módů):

- **Sken celého spektra hmot, základní sken (Full scan):** Dochází k záznamu celkového iontového proudu, tedy všech m/z procházejících detektorem v čase. Tento typ záznamu poskytuje velké množství informací. Je možné z něj vybrat konkrétní hodnotu m/z a sledovat ji v čase, zjistit spektrum v určitém čase, odečíst spektrum mobilní fáze od vzorku atd. Pro kvantifikaci je však tento sken u přístrojů s jednotkovým rozlišením méně přesný a je lepší využít specifitější typy záznamů. Full scan je také nejnáročnější na paměťová zařízení vzhledem k velikosti jeho souborů v PC.
- **Selektivní záznam vybraného iontu (Selected ion monitoring – SIM):** V tomto případě zaznamenává detektor pouze zvolenou hodnotu m/z v čase. Díky tomu dochází ke značnému nárůstu citlivosti i selektivity v porovnání se skenem celého spektra. Je možné sledovat i několik zvolených m/z současně. Tento typ záznamu se využívá v kvantitativní analýze.
- **Záznam zvolených iontových reakcí (Selected reaction monitoring – SRM):** Umožňuje sledovat přechod konkrétního parentního m/z na konkrétní fragment (nebo několik fragmentů), což je vysoce specifický způsob detekce. Oproti základnímu skenu poskytuje podstatně vyšší citlivost a selektivitu, proto se jedná o nejpoužívanější typ skenu v kvantitativní analýze.
- **Sken produktových iontů (Product ion scan – PR):** Sledují se produktové ionty po fragmentaci vybraného prekurzoru (vybraného m/z). Tento záznam poskytuje informace o struktuře látky a využívá se ke strukturní analýze.
- **Záznam prekurzorových iontů (Precursor ion scan – PI):** Pro vybraný produktový iont se zjišťuje původní iont prekurzoru (resp. všechny m/z , které produktový iont generují). Také tento sken poskytuje informace o struktuře látky. Umožňuje detekci analytů obsahujících vybranou funkční skupinu nebo detekci sloučenin s podobnou strukturou na základě jejich charakteristického fragmentového iontu.
- **Sken neutrálních ztrát (Neutral loss scan – NL):** Umožňuje detekci látek se stejnou funkční skupinou, u kterých dochází ke ztrátě stejné neutrální částice o konkrétním m/z . Zjištění přítomnosti různých charakteristických skupin (konkrétní ztráty m/z) je výhodné ve strukturní analýze látek [28].

Je tedy zřejmé, že hmotnostní spektrometr poskytuje v porovnání s jinými detektory celou řadu informací o struktuře analyzovaných látek a umožňuje specificky zvolit typ skenu dle požadavků analýzy [28].

Je třeba ale zdůraznit, že specifickými pravidly se při použití hmotnostního spektrometru řídí výběr mobilní fáze. Aby nedošlo k poškození přístroje zanesením jeho vnitřních částí (především iontové optiky) netěkavými složkami mobilní fáze, je nutné při analýze používat pouze těkavé mobilní fáze. Netěkavé složky mobilních fází používané při jiných způsobech detekce, typicky fosfátové pufrů, je třeba nahradit složkami těkavými, např. mravenčanem amonným. Existují však situace, kdy je užití netěkavé složky mobilní fáze nezbytné. U některých látek typu chelátorů železa bylo zjištěno, že reprodukovatelné výsledky lze efektivně zajistit přidávkem malého množství EDTA do mobilní fáze. Při použití 5 μ M EDTA v mobilní fázi nebyla pozorována kontaminace přístroje spojená se sníženou citlivostí. Množství mobilní fáze (s přidávkem EDTA) vstupující do iontového zdroje je možné minimalizovat pomocí vhodně naprogramovaného přepínacího ventilu. Dále je třeba myslet na parametry mobilní fáze, které mohou ovlivnit ionizaci. Obecně je třeba použít nižších průtoků a dostatečného zastoupení organické složky mobilní fáze (methanol, acetonitril), což usnadňuje odstranění mobilní fáze před vstupem do analyzátoru. Účinnost ionizace analyzovaných látek obvykle ovlivňuje také přítomnost složek matrice. Mluvíme v tomto případě o tzv. „efektu matrice“, který vede buď ke snížení nebo naopak ke zvýšení intenzity signálu. Tento jev pak ovlivňuje zejména detekční a kvantifikační limity a opakovatelnost metody [7, 25, 26, 28, 33].

Další používané detektory v HPLC

- **Fluorescenční**
- **Refraktometrické**
- **Elektrochemické**
- **Corona charged aerosol detectors (CAD)**
- **Evaporative light scattering detectors (ELSD) [2, 6, 7, 10]**

Zařízení pro zpracování dat

Každý detektor poskytuje jako výstup elektrický signál, který je zpracován analytickým softwarem. Software dále zajišťuje ovládání celého HPLC systému. Vlastní měření série vzorků může probíhat po naprogramování zcela automaticky. PC umožňuje

přehlednou a efektivní práci se získanými daty (integrace píků, výpočty linearity, symetrie píků atd.). Data mohou být snadno uchována. Je však třeba počítat s čím dál vyššími nároky na kapacitu paměťových zařízení (HRMS záznamy přesahují i 10 GB) [8].

3.1.2 Současné trendy v HPLC analýze léčiv

Mezi významné trendy v chromatografické analýze patří mimo jiné snaha o miniaturizaci ve spojení se zachováním vysoké citlivosti detekce. Stejně jako ve všech odvětvích lidské činnosti je i zde kladen důraz na ochranu životního prostředí, zejména na snižování spotřeby organických rozpouštědel. Vzhledem k čím dál vyšším nárokům na počet provedených měření je klíčová také snaha o zkrácení analýz, ale při zachování kvality získaných dat. Proto byla vyvinuta celá řada moderních metod, které splňují výše zmíněné požadavky, jež jsou dnes na bioanalytické metody kladeny [34, 35].

Níže jsou okomentovány vybrané trendy v HPLC s ohledem na jejich využití v analýze léčiv:

Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-high performance liquid chromatography – UHPLC)

Jedná se o modifikaci klasické HPLC instrumentace, která umožňuje pracovat s vyššími tlaky v systému (až 130 MPa). Vyšší tlaková odolnost těchto chromatografických sestav je dána speciální konstrukcí, kdy jsou méně odolné plastové části nahrazeny obvykle nerez ocelí, je použito pevných spojů a také pump a ventilů odolných vůči vysokému tlaku. Důležitou roli v UHPLC systému hraje také zpřesněný automatický nástřikový systém a minimalizovaný mrtvý objem, kterého je dosaženo za použití kapilár s malým vnitřním průměrem [36, 37].

S vyšší tlakovou odolností systému je spojena možnost použít chromatografické kolony plněné malými částicemi sorbentu (pod 2 μm), což přináší značné zvýšení separační účinnosti. To v kombinaci se zkracováním kolon a zmenšováním jejich vnitřního průměru umožňuje docílit podstatného zrychlení prováděných analýz. Při přenosu metody z HPLC na UHPLC systém tedy obvykle získáme ostřejší píky v kratším čase. Mezi další výhody UHPLC patří nižší spotřeba analyzovaných vzorků a organických rozpouštědel, s čímž souvisí vyšší ekologičnost i ekonomičnost metody. Stejně jako v případě HPLC může být UHPLC systém vhodně optimalizován dle potřeb analýzy. Lze použít široké spektrum

dostupných chromatografických kolon s různými stacionárními fázemi a všech dostupných detektorů včetně hmotnostního spektrometru [36-39].

Nevýhodou je však v porovnání s HPLC podstatně vyšší cena tohoto systému a nutnost nastříkovat vzorky o vyšší čistotě. V porovnání s klasickým HPLC je zde vyšší riziko ucpání kolony vzhledem k použití menších částic sorbentu. UHPLC je možné využít ve všech aplikacích jako HPLC. Vzhledem k ušetřenému času a všestrannosti metody je dnes UHPLC v bioanalýze upřednostňováno [38, 39].

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (Hydrophilic interaction liquid chromatography – HILIC)

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie je velmi podobná separaci na normálních fázích. Byla vyvinuta především pro separaci velmi polárních látek, které jsou na reverzních fázích špatně zadržovány. HILIC kolony jsou naplněny hydrofilní stacionární fází, která se obvykle vlastní separace neúčastní, ale váže na svém povrchu vodu z mobilní fáze. Mobilní fáze má vysoký podíl organické složky (i přes 90%), nejčastěji se používá acetonitril. Vodná složka mobilní fáze vytváří imobilní vrstvu na povrchu stacionární fáze kolony. Do této vrstvy se z mobilní fáze rozdělují separované analyty. Hydrofilnější látky jsou silněji zadržovány a eluují se později. Pořadí separovaných látek je obvykle stejné jako při chromatografii na normálních fázích (tj. opačné oproti RP chromatografii). Vyšší obsah vody v mobilní fázi v tomto případě zvyšuje její eluční sílu. Díky vysokému obsahu organické složky v mobilní fázi je možné použít vyšších průtoků a často dochází ke zvýšení citlivosti při MS detekci. Vzhledem ke schopnosti metody dobře separovat polární látky bývá HILIC často využívána v bioanalýze (proteomika, separace polárních metabolitů atd.) [19, 40-42].

Chromatografie na čípech

Jedná se v podstatě o náhradu chromatografické kolony. Můžeme se setkat i s tzv. laboratoří na čipu, která spojuje různé analytické postupy na malé destičce o rozměru několika centimetrů čtverečních. Čip tedy obsahuje miniaturní pumpy, kanály, směšovače, ventily – kompletní instrumentaci nutnou pro analýzu. Chromatografie na čípech umožňuje velmi rychlou analýzu, tj. možnost provedení více analýz za stejnou časovou jednotku. Další výhodou jsou nízké nároky na množství organických rozpouštědel a analyzovaného vzorku, což je výhodné například u vzorků slz, mozkomíšního moku atd. Čipy lze propojit s MS detekcí. V současné době se využívají především v analýze proteinů, peptidů, nukleotidů, ale i malých molekul [35, 43].

Dvourozměrná kapalinová chromatografie (2D-HPLC)

V systému dvourozměrné chromatografie jsou frakce eluované z první kolony převáděny pomocí přepínacích ventilů a dávkovacích smyček do kolony druhé. Cílem metody je zvýšení separační účinnosti chromatografického systému. V porovnání s běžnou HPLC poskytuje metoda vyšší rozlišení a selektivitu. Na druhou kolonu jsou převáděny buď všechny frakce z první kolony (úplná 2D-HPLC), nebo jen vybrané frakce (částečná 2D-HPLC). Úplná varianta je vhodná pro komplexní směsi, separace v druhé dimenzi však musí být velice rychlá (vždy rychlejší než v dimenzi první). Částečnou 2D-HPLC je možné separovat koeluující píky z problematické části první dimenze. V tomto případě jsou nároky na rychlost separace v druhé dimenzi nižší. 2D-HPLC lze využít k separaci komplikovaných směsí látek podobných vlastností (směsi peptidů, lipidů atd.) [34, 44].

3.1.3 Vyhodnocení získaných dat

Výstupní informací při HPLC analýze je křivka závislosti čas-odezva detektoru, tzv. chromatogram. Umožňuje nám provést jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzu [1, 7].

Kvalitativní analýza

Identifikaci látky lze provést srovnáním retenčního času analytu se známým (referenčním) standardem za stejných podmínek analýzy. V případě analýzy neznámého vzorku ukazuje na vysokou pravděpodobnost shody se standardem až shoda retenčních časů na dvou stacionárních fázích s odlišnou selektivitou. Dále může k identifikaci látek přispět použití vhodného detektoru, např. UV detektoru s diodovým polem, ale především hmotnostního spektrometru, případně NMR [1-3].

Kvantitativní analýza

Kvantitativní analýza se v drtivé většině případů provádí pomocí plochy chromatografických píků – ta odpovídá množství stanovované látky. Integraci lze provést s pomocí vhodně nastaveného software automaticky. Pro kvantifikaci lze využít následující základní přístupy [1, 7, 45]:

Metoda vnějšího standardu

Provedou se dvě měření za stejných podmínek. V jednom měření se analyzuje vzorek o neznámé koncentraci analyzované látky, v druhém pak standard hodnocené látky o známé koncentraci. V ideálním případě se použije chemická referenční látka (CRL). Obsah hodnocené látky se vypočítá na základě poměru ploch v obou vzorcích a koncentrace standardu [3, 46].

Pomocí série standardů o různé známé koncentraci lze také připravit kalibrační přímku (křivku) – závislost odezvy detektoru na koncentraci. Po změření vzorku s hodnocenou látkou je možné z odezvy vypočítat příslušnou koncentraci. Oproti srovnání s jediným standardem je tato metoda přesnější [2].

Metoda vnitřního standardu

Jedná se o analogický postup jako u metody vnějšího standardu. I v tomto případě je třeba proměřit standardní a neznámý vzorek. Na rozdíl od předchozí metody se však do obou vzorků přidá známé stejné množství tzv. vnitřního standardu (internal standard – IS). K výpočtu jsou následně použity poměry ploch stanovované látky k vnitřnímu standardu (platí jak pro stanovovaný, tak známý vzorek) [2, 45, 46].

Při výběru vhodného vnitřního standardu je třeba dbát na to, aby měl podobné vlastnosti jako hodnocená látka. Musí být jasně charakterizován a dostupný v dostatečné čistotě, nesmí žádným způsobem narušit analýzu (interference s mobilní fází, látkami vzorku, HPLC systémem atd.) a měl by být eluován v blízkosti analyzované látky. I za použití této metody je možné sestavit kalibrační přímku. Platí zde stejná pravidla jako u metody vnějšího standardu. Jediným rozdílem je, že kalibrační přímkou je závislost poměru ploch analytu/IS ku koncentraci. [45].

Do jisté míry specifický je výběr vnitřního standardu při použití hmotnostně spektrometrické detekce. V tomto případě se často využívá vnitřní standard značený stabilním izotopem (stable isotopically labeled – SIL). Jedná se o hodnocenou látku, v níž byly například některé atomy vodíku nahrazeny deuteriem nebo došlo k záměně uhlíku za ^{14}C . Doporučuje se, aby se molekulová hmotnost SIL oproti analytu lišila minimálně o tři, ideálně o čtyři až pět daltonů. Dojde tak ke změně hodnoty m/z , ale zůstanou zachovány ostatní fyzikálně-chemické vlastnosti látky. Díky tomu by měl SIL standard v kvantitativní bioanalytické studii velmi dobře kompenzovat případné problémy se stabilitou, výtěžností i efektem matrice. Obvykle je však poměrně drahý a u nových látek nemusí být vždy komerčně

dostupný. V tomto případě se pro LC-MS analýzu využívá stejně jako u jiných způsobů detekce strukturně blízký analog s podobným retenčním chováním [47-49].

Použití vnitřního standardu je klíčové především u komplikovaných vzorků, resp. složitých postupů úpravy vzorků před analýzou. Typickým příkladem je hodnocení léčiv v biologickém materiálu. Při analýze s využitím LC-MS je použití IS pro kvantifikaci analytů doporučeno vždy [4, 45].

Metoda standardního přídatku

Změří se analyzovaný vzorek a stejný vzorek po přidání známého množství analyzované látky. Dojde k nárůstu plochy hodnocené látky, která je přímo úměrná přidanému množství. S využitím série vzorků s různými přídatky lze sestavit také kalibrační přímku (křivku). Tuto metodu je nutné použít, pokud není dostupná čistá matrice (tedy bez analyzované látky) pro přípravu standardního porovnávacího vzorku. Typickým příkladem je analýza endogenních látek v biologickém materiálu nebo toxikologická analýza [2].

Metoda vnitřní normalizace

Jedná se o jednoduchou metodu, při které se měří pouze jeden vzorek. Po analýze se zintegrují všechny píky záznamu. Jednotlivé plochy píků odpovídají procentuálnímu zastoupení daných látek. V bioanalýze se však tato metoda nevyužívá [2].

3.2 Úprava vzorků před HPLC analýzou

3.2.1 Biologické vzorky

Nedílnou součástí HPLC analýzy je fáze přípravy vzorků. Většinu biologických vzorků není možné bez úpravy do chromatografického systému vůbec nastříknout. Jedná se často o velice komplikované směsi obsahující řadu nečistot a balastů (součásti matrice atd.). Tyto látky je před analýzou třeba odstranit nebo alespoň minimalizovat jejich množství, neboť mají často negativní vliv na získané výsledky. Mohou zhoršit citlivost detekce, píky balastů mohou interferovat s píky analyzovaných látek, ale především může řada těchto nežádoucích nečistot (například proteiny) ucpat a tím někdy i nenávratně zničit chromatografickou kolonu. [50, 51].

Úpravu vzorků je obvykle nutné z větší části provádět manuálně, s čímž souvisí i významně vyšší časová náročnost v porovnání s následnou automatizovanou analýzou. Významný vliv lidského faktoru ve zpracování vzorků také způsobuje, že většina chyb během celého analytického procesu nastává v této fázi. Proto je moderním trendem snaha automatizovat i přípravu vzorků, její část, nebo alespoň použití co nejjednodušších manuálních postupů. V rámci snahy o ochranu prostředí je kladen důraz i na redukci spotřeby organických rozpouštědel a nebezpečných látek [51, 52].

Vhodně zvolený procesu úpravy vzorku nám však může poskytnout i několik výhod důležitých pro následnou analýzu. Vzorek je například možné zakoncertovat a tím zvýšit citlivost metody, nebo analyt derivatizovat a ovlivnit tím jeho fyzikálně-chemické vlastnosti, obvykle s cílem zlepšení detekce (např. zavedení fluoroforu a podobně) nebo zvýšení těkavosti [50, 53].

V dnešní době může být analyzován v podstatě libovolný biologický vzorek, nejčastěji se však setkáváme s krví, plasmou, močí, stolicí atd., avšak ani analýzy slin, žluči, lyzátů různých tkání nebo subcelulárních frakcí nejsou výjimečné. Obecně platí, že z pohledu úpravy jsou méně komplikované tekutější vzorky. Jejich zpracování je méně technicky i časově náročné. Úplně bez úpravy lze však do systému nastříknout naprosté minimum vzorků (např. moč, mozkomíšní mok) [52, 54].

3.2.2 Základní metody úpravy vzorků

Deproteinace

Deproteinace (odstranění proteinů) je základní a v porovnání s ostatními metodami méně náročnou variantou úpravy biologického vzorku. Lze ji provádět několika různými způsoby [54, 55].

Precipitace – Deproteinace chemickými činidly

Metoda spočívá v denuraci (nevratné změně terciární a kvartérní struktury) bílkovin obsažených ve vzorku. Toho lze dosáhnout nejčastěji přidavkem organického rozpouštědla (methanol, ethanol, acetonitril atd.), ale lze použít i silné kyseliny, zásady, soli těžkých kovů nebo lze provést denuraci působením tepla. Precipitační činidla je možné použít i v různých kombinacích. Při volbě precipitačního činidla je třeba zohlednit fyzikálně-chemické vlastnosti analytu. Například použití silných kyselin/zásad může způsobit rozklad hodnocených látek. Precipitovaný vzorek se následně centrifuguje, aby bylo možné odebrat čistý supernatant. Obvykle následuje i filtrace získaného supernatantu pro odstranění zbytku nečistot a zajištění maximální ochrany chromatografické kolony [52, 53, 55].

Precipitace je používána především pro její rychlost, jednoduchost a cenu provedení. Na druhou stranu může docházet ke snížení citlivosti analýzy vlivem zředění vzorku a případně k interferencím ze zbytkových balastů. Dále existuje riziko vazby analyzovaných látek na vzniklý precipitát [52, 54, 55].

Enzymová deproteinace

K odstranění proteinů lze využít také enzymy (např. proteolytické enzymy trypsin, papain). Vzhledem k časové náročnosti se však jedná pouze o okrajově používanou metodu. [54].

Ultrafiltrace

Ultrafiltrace využívá semipermeabilní membrány k oddělení dvou frakcí vzorku – vysoko a nízkomolekulární. Separaci lze ovlivnit volbou požadované velikosti pórů membrány. V praxi je z časových důvodů nutné proces urychlit. Lze toho docílit například tlakem pístu nebo odstředivou silou centrifugy. Vzhledem k tomu, že volná frakce léčiva projde membránou, ale frakce vázaná na bílkoviny zůstane na druhé straně membrány,

využívá se metoda pro stanovení látek s nízkou vazností na plazmatické proteiny nebo při stanovení volné frakce léčiva [9, 54, 56].

Extrakce organickým rozpouštědlem (Liquid-liquid extraction – LLE)

LLE je založena na rozdělování látek mezi dvě nemísitelné kapaliny na základě Nernstova rozdělovacího koeficientu, který definuje poměr mezi koncentracemi látky rozpuštěné v těchto dvou kapalinách:

$$k = c_o / c_v \quad (1)$$

k – rozdělovací koeficient

c_o – koncentrace látky v organické složce

c_v – koncentrace látky ve vodné složce

Vlastní biologický vzorek je v tomto případě vodnou fází, nepolární fází představuje přidané organické rozpouštědlo. Do organického rozpouštědla přecházejí neutrální lipofilní látky. Látky hydrofilní povahy (např. nabitě ionty) zůstávají převážně ve vodné fázi. Pro dosažení maximální extrakční výtěžnosti je třeba, aby c_o dosahovala co nejvyšší hodnoty, což je možné ovlivnit mnoha faktory [9].

Optimální je pro extrakci použít organické rozpouštědlo s polaritou blízcí se analyzované látce. Dále je potřeba optimalizovat délku a intenzitu vytřepávání. Vyšší výtěžnosti je obvykle dosaženo opakovanou extrakcí z vodné složky, a to správně zvoleným množstvím rozpouštědla (často v poměru vodná / organická složka v rozmezí cca od 1:5 do 1:10). Naprosto zásadní roli pak hraje volba pH vodné fáze. Pomocí vhodného pH lze ovlivnit selektivitu extrakce – zvýšení pH usnadní extrakci bazických molekul, naopak snížení pH usnadní přechod kyselin do organické fáze (potlačení ionizace). Hodnotu pH lze přizpůsobit pomocí pufrů, případně kyselin a bazí [9].

Běžně se extrakce provádí za použití ethylacetátu, chloroformu, etherů, dichlormethanu, alifatických uhlovodíků a podobně. Získanou organickou složku s rozpuštěným analytem je možné odpařit a zbytek rekonstituovat dle potřeby v menším objemu rozpouštědla kompatibilního s analytickým systémem. Tento krok vede k zakoncentrování analytu a zvýšení citlivosti metody, což umožňuje analyzovat i stopové koncentrace látek. Metoda není příliš náročná na vybavení a při vhodně zvolených podmínkách nabízí dobrou výtěžnost pro látky s různou polaritou. Je ovšem poměrně pracná,

zdlouhavá a vzhledem k nutnosti použití většího množství organických rozpouštědel zatěžuje životní prostředí [9, 52].

Extrakce na pevných fázích (Solid phase extraction – SPE)

SPE je moderní metodou úpravy biologického vzorku a nachází v chromatografické analýze čím dál častější uplatnění. Jednotlivé interakce a retenční mechanismy SPE vychází ze stejných principů jako v případě separace na HPLC. V ideálním případě je zachyceno maximum hodnoceného léčiva a minimum balastních látek [52, 54, 57].

Nejčastěji se využívá sorbentů na principu reverzních fází, ale lze uplatnit i další separační mechanismy (iontoměniče, mixed-mode sorbenty, grafitický uhlík atd.). Na rozdíl od HPLC kolon mají SPE sorbenty řádově větší částice (desítky μm), a tak k pohybu kapaliny skrz ně není třeba tak vysokých tlaků. Obvykle se jako hnací síla procesu používá podtlak vytvořený vakuovým čerpadlem. Větší částice se nepoužívají, aby byla zachována dostatečná sorpční kapacita. Zároveň je důležité, aby sorpce analytu byla reverzibilní [54, 57].

Vlastní sorbent je nejčastěji umístěn do polypropylenových kolonek ve tvaru stříkaček (cartridge). Další možností je použití extrakčních disků, kde je sorbent uspořádán do sítě vláken, použití jednotlivých vláken potažených sorbentem – tzv. SPME (Solid phase microextraction) nebo vpravení SPE sorbentu přímo do pipetovacích špiček. Z časových důvodů se při extrakci pomocí SPE kolonek používá zařízení umožňující extrakci na několika kolonkách zároveň, což proces značně urychluje. Vlastní extrakce se skládá z několika kroků [9, 57]:

- **Aktivace sorbentu:** Před použitím je nutné aktivovat funkční skupiny sorbentu, čehož je v případě reverzní fáze nejčastěji dosaženo pomocí methanolu či acetonitrilu. Následně se kolonka obvykle promyje vodou nebo pufrem, aby bylo odstraněno nadbytečné organické rozpouštědlo, které by mohlo způsobit precipitaci vzorku a ucpání kolonky.
- **Nanesení vzorku:** Před nanesením vzorku by kolonka již neměla vyschnout. Po nanesení vzorku na extrakční kolonku dochází k zachycení analytu na sorbentu.
- **Odstranění nečistot:** Kolonka se promyje, aby došlo k odstranění balastních látek (zbytků matrice atd.). V případě reverzních fází se k promytí používá především voda a pufry, které efektivně odstraní hydrofilní látky. Spektrum vymytých a odstraněných látek lze ovlivnit příměsí organického rozpouštědla. Analyty jsou zadrženy sorbentem kolonky.
- **Eluce analytu:** K vymytí analytu se použije silnější eluční činidlo (methanol, acetonitril atd.), které naruší vazby mezi analytem a sorbentem. Takto získaný eluát lze již přímo

nastříknout do HPLC systému nebo dle potřeby dále upravit (zakoncentrovat, derivatizovat, změnit rozpouštědlo atd.).

- **Reaktivace sorbentu:** SPE kolonky jsou ve většině případů na jedno použití. Při analýze jednodušších biologických matric bez přítomných proteinů (např. moč) lze však kolonky použít i vícekrát a proces tak finančně zefektivnit [9, 57].

Metoda umožňuje velice účinné oddělení analytu od zbytku nečistot, a tak v ideálním případě získáme velmi čistou frakci bez balastních látek. Zároveň proces SPE vzorek filtruje což odstraní případné pevné částice. Další výhodou zejména pro stopovou analýzu je možnost zakoncentrování vzorku. Díky menší spotřebě organických rozpouštědel je metoda ekologická. Hlavními nevýhodami této metody jsou možnosti mírných odchylek mezi jednotlivými šaržemi extrakčních kolonek, pracnost a cena [9, 54].

Postup je možné do značné míry automatizovat s využitím on-line SPE-HPLC. V tomto uspořádání je modifikovaná extrakční kolona připojena přímo k HPLC systému pomocí vícecestného ventilu, který na základě nastaveného programu automaticky provede celý SPE postup. Nečistoty jsou z kolonky odvedeny do odpadu, vlastní analyt je pomocí ventilu po vymytí přeměrován na HPLC kolonu. Tento postup je výhodný z hlediska úspory času, spotřeby rozpouštědel, rizika kontaminace vzorku i redukce drobných odchylek ve zpracování vzorků, které se mohou objevit při ručním postupu. Nevýhodou metody je především nákladnost vybavení [58].

Další zajímavou modifikací běžného SPE představuje také tzv. hybrid SPE, které se využívá k selektivnímu odstranění fosfolipidů a precipitovaných proteinů z analyzovaného vzorku. Fosfolipidy jsou selektivně zadrženy díky interakci typu Lewisova kyselina-báze mezi orbitály molekul oxidu zirkoničitého, které jsou vázány jako součást stacionární fáze, a fosfátovou skupinou fosfolipidů. Jako precipitační činidlo se využívá především acetonitril. Tento postup je obzvláště vhodný při použití detekce pomocí hmotnostního spektrometru, neboť dochází ke značné redukci efektu matrice [59, 60].

SPE extrakce je také vhodná k miniaturizaci. Na principu miniaturizace SPE je založena např. metoda MEPS (Microextraction by packed sorbent), při níž se místo SPE kolonky používá k extrakci vzduchotěsná patrona naplněná sorbentem. Lze ji využít pro vzorky o objemu od 10 do 1000 μ l a stejně jako v případě SPE lze postup modifikovat za účelem on-line propojení s HPLC. V porovnání s SPE je MEPS jednoduchý a rychlý postup, šetří spotřebu organických rozpouštědel a používané sorbenty lze použít až na sto analýz [59, 61].

3.3 Validace bioanalytických metod

3.3.1 Význam validace metody

Před použitím pro analýzu reálných vzorků je potřeba provést validaci metody, tj. prokázat, že je metoda spolehlivá a vhodná k zamýšlenému účelu. Toho lze docílit provedením předepsaných experimentů a vyhodnocením definovaných parametrů [7, 45].

Validace bioanalytických metod se většinou provádí dle dokumentu s názvem „Guidance for Industry – Bioanalytical Method Validation“, který byl vydán americkým úřadem pro kontrolu potravin a léků (Food and Drug Administration – FDA). Tato směrnice shrnuje všechny hodnocené parametry, jejich přípustné odchylky a postupy při validaci bioanalytické metody (např. hodnocení léčiv a metabolitů v biologickém materiálu). Jedná se však pouze o doporučení a postupy mohou být specificky modifikovány dle požadavků validované metody a jejího účelu. V současné době je v připomínkovém řízení aktualizovaná verze FDA směrnice, která by již měla být více zaměřena na nejmodernější nároky analýzy, především z hlediska selektivity a matricových efektů. Evropskou obdobou tohoto dokumentu je směrnice „Guideline on Validation of Bioanalytical Methods“, která byla vydána evropskou agenturou pro léčiva (EMA). Oproti původní FDA směrnici se jedná o novější dokument, který odráží nejnovější požadavky na analytické metody. Zahrnuje tedy již i některé další parametry, jako matricový efekt nebo diluční integritu [62, 63].

Validaci lze rozdělit na tři typy:

Plná validace

Plná validace zahrnuje hodnocení všech předepsaných validačních parametrů, je tedy časově nejnáročnější. Provádí se pouze při vývoji nové metody, při analýze nového léčiva, případně při kvantifikaci dříve nehodnoceného metabolitu léčiva a podobně [62, 63].

Částečná validace

Provádí se při pozměnění již používané metody (změna detekční techniky, jiná biologická matrice atd.) nebo při přesunu metody mezi laboratořemi. Dle charakteru provedené změny může být vyžadováno rychlé ověření několika validačních parametrů, ale také provedení téměř plné validace [62, 63].

Křížová validace

Jedná se o porovnání parametrů dvou analytických metod (např. porovnání dvou metod úpravy vzorku nebo způsobů detekce), případně stejné metody používané v různých laboratořích. Rozdíl naměřených hodnot by neměl být větší než 15 % [62, 63].

Provedení validace probíhá na základě předem zpracovaného validačního protokolu, který vychází obvykle ze směrnice FDA, ale zohledňuje vlastnosti analytu, účel metody a podobně. Součástí tohoto protokolu jsou kritéria, která musí metoda splnit. Pokud v jakémkoliv z kritérií metoda nevyhoví, je třeba ji upravit a validaci provést znovu. Pokud je to možné, provádí se validace s chemickým referenčním standardem dané látky. Pokud není dostupný, je nutné použít co nejlépe chemicky definovanou látku (pomocí MS, IČ, NMR apod.) [62, 63].

Hodnocení validačních parametrů není ukončeno ani po validaci metody. V běžném provozu je nutné i u zvalidované metody neustále ověřovat její spolehlivost. Toho je docíleno prováděním testu způsobilosti systému (System suitability test – SST), který má být navržen během procesu validace a ověřuje rizikové parametry metody. Pokud metoda nevyhoví testu způsobilosti, je možné provést drobné (definované) úpravy a test opakovat. Běžně hodnocenými parametry jsou faktor symetrie pík, rozlišení, citlivost nebo reprodukovatelnost metody. Při měření každé série reálných vzorků se také připravuje kalibrační křivka a poslední úrovní ověření funkčnosti metody je ověření správnosti výpočtu koncentrace QC vzorků (vzorky kontroly kvality), které jsou přidány mezi analyzované vzorky [46, 64].

3.3.2 Validační parametry

Hodnocení jednotlivých validačních parametrů musí být provedeno zvlášť pro každou analyzovanou látku. Mezi tyto parametry patří [62, 65]:

Selektivita (Selectivity)

Selektivita vyjadřuje schopnost metody detekovat hodnocené analyty, odlišit je od ostatních součástí biologické matrice (plasma, moč, krev atd.). K jejímu ověření se používají prázdné vzorky (tzv. blankové vzorky – bez přítomného analytu) daného biologického materiálu. Aby byla vyloučena možná variabilita, používá se tento materiál minimálně z šesti

různých zdrojů. Selektivita metody musí být dostatečná i na nejnižším limitu kvantifikace (Lower limit of quantitation – LLOQ) [7, 62].

Přesnost (Precision)

Přesnost vyjadřuje pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) rozptyl jednotlivých naměřených koncentrací analytu v alespoň pěti vzorcích připravených stejným postupem (ve stejný čas, ze stejného zdroje). Toto hodnocení se provádí na minimálně třech (v případě EMA čtyřech) koncentračních úrovních (z nichž 2 ohraničují kvantitativní rozsah metody).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (2)$$

$$RSD(\%) = 100SD / x \quad (3)$$

x – průměrná hodnota změřené koncentrace

N – počet provedených stanovení

x_i – jednotlivé změřené koncentrace

Hodnocení přesnosti můžeme dále rozdělit na určení přesnosti v rámci jednoho dne, jedné série vzorků (opakovatelnost) a hodnocení mezi různými sériemi (mezilehlá přesnost), mezi nimiž může proběhnout několik dní, případně jsou připraveny za použití různých šarží chemikálií. Hodnota RSD nesmí přesáhnout 15 %. Výjimku tvoří LLOQ, kde je dle směrnice tolerance 20 % [7, 45, 62, 63].

Správnost (Accuracy)

Správnost metody se ověřuje měřením minimálně pěti vzorků o přesně známé koncentraci na minimálně třech (v případě EMA čtyřech) koncentračních úrovních. Popisuje rozdíl mezi naměřenou hodnotou a skutečnou koncentrací analytu ve vzorcích. Stejně jako v případě přesnosti se koncentrační úrovně volí dle očekávaných koncentrací reálných vzorků a dvě z těchto úrovní ohraničují kvantifikační rozsah metody. Maximální tolerovaná odchylka od skutečné koncentrace na LLOQ je 20 %, na ostatních úrovních nesmí přesáhnout 15 % [7, 45, 62, 63].

Výtěžnost (Recovery)

Výtěžnost popisuje kvalitu úpravy biologického vzorku před nástřikem na kolonu. Je vyjádřena procentuálním rozdílem v ploše píku analytu, který byl v jednom případě přidán do prázdné matrice před úpravou vzorku a v druhém případě po provedení extrakce. Hodnocení výtěžnosti se pro všechny analyzované látky provádí na třech koncentračních úrovních. Vnitřní standard se hodnotí pouze na té koncentraci, na které bude používán. Získané hodnoty se nemusí nezbytně blížit 100 %. Je však třeba, aby byly reprodukovatelné a pokud možno na všech koncentračních úrovních stejné [62, 65].

Kalibrační křivka (Calibration curve)

Aby bylo možné kvantifikovat analyty přítomné ve vzorku, je třeba popsat závislost odezvy detektoru na jejich koncentraci. K tomuto účelu slouží kalibrační křivka a její matematické vyjádření. Pro její sestavení se většinou používá šest až osm vzorků o známé různé koncentraci, která je v rozmezí očekávaných koncentrací reálných vzorků včetně LLOQ. Současně se pro kontrolu proměřují vzorky blankové matrice a tzv. nulové vzorky (bez přidaného analytu, ale s vnitřním standardem) [7, 62, 63].

Vztah koncentrace-odezva detektoru nemusí nezbytně popisovat přímka. Volíme nejjednodušší matematický model, který tento vztah adekvátně popisuje. K výpočtu se nepoužívají blankové ani nulové vzorky. Kalibrační křivka vyhovuje požadavkům směrnice, pokud se odečtená koncentrace alespoň 75 % standardů (minimálně však šesti) neliší od skutečné koncentrace o více než 15 %. V případě LLOQ je tolerance opět až 20 %. Vynechání nevyhovujících bodů nesmí ovlivnit použitý matematický model. Dle směrnice EMA by měly být vyhodnoceny alespoň tři kalibrační křivky pro každý analyt. Dále je nutné, aby byl pík analytu na úrovni LLOQ dobře separovaný, jasně identifikovatelný, alespoň pětikrát vyšší v porovnání s blankem a při jeho hodnocení musí být dosaženo správnosti s relativní směrodatnou odchylkou do 20 % [62, 63].

Stabilita (Stability)

Stabilitu analyzovaných látek je třeba ověřit, abychom si mohli být jistí, že v době nástřiku vzorku na kolonu je v něm stále stejné množství léčiva jako při jeho odběru, a změřená koncentrace tedy nebude ovlivněna rozkladem látky. Na stabilitu dané látky má vliv celá řada faktorů, od jejich fyzikálně-chemických vlastností až po okolní vlivy, jako teplota, světlo, atmosféra atd. Hodnocení stability by mělo co nejlépe odpovídat podmínkám, kterým

budou vzorky vystaveny při reálných analýzách (příprava vzorku, doba skladování, teplota okolí atd.). Hodnocení stability se provádí zvlášť pro každou matici i skladovací zařízení, protože i záměna skladovacího zařízení může stabilitu značně ovlivnit. Dle potřeb metody může být nezbytné ověřit jak krátkodobou, tak dlouhodobou stabilitu [62, 63].

Stabilita po zmrazení a rozmrazení

Provádí se především pro vzorky určené k dlouhodobému skladování, které mohou být vícekrát analyzovány, a tedy i rozmrazeny. Zmrazení a rozmrazení za laboratorní teploty se většinou opakuje třikrát, a to se vzorky o vysoké a nízké koncentraci léčiva. K zamrazení je možné použít i teploty -70 až -80 °C [62].

Krátkodobá stabilita

Vzorky jsou rozmrazeny a ponechány za podmínek, za kterých bude probíhat příprava reálných vzorků (čas, teplota, světlo atd.). Krátkodobá stabilita se může hodnotit v rozsahu od několika desítek minut až po 24 hodin [62].

Dlouhodobá stabilita

Hodnotí se za očekávaných skladovacích podmínek. Hodnocená doba musí přesahovat očekávanou dobu od odběru vzorků až po vlastní analýzu a použité vzorky musí mít dostatečný objem, aby z nich bylo možné provést nejméně tři analýzy. Opět se hodnotí vzorky o více koncentracích (nízká/vysoká) [62].

Stabilita v zásobním roztoku

Slouží k ověření stability zásobních roztoků, ze kterých budou v praxi připravovány standardní vzorky (linearita, QC vzorky). Hodnotí se u všech použitých analytů, ale také u roztoku vnitřního standardu [62].

Stabilita hotových vzorků

Vzorky se obvykle připravují ve větších sériích, a nemohou být tedy všechny analyzovány okamžitě. Proto je dalším hodnoceným parametrem stabilita již připravených vzorků, které jsou uskladněny v autosampleru přístroje, kde čekají na analýzu. V závislosti na počtech vzorků a délce HPLC metody se zvolí také délka tohoto hodnocení. Vhodné je počítat s dostatečnou rezervou, pokud by bylo třeba některé analýzy nebo celou sérii opakovat (např. z důvodu výpadku proudu, chyby v softwaru a podobně) [62].

Diluční integrita (Dilution integrity)

Pokud budeme pracovat se vzorky o vyšší koncentraci, než pro kterou byla metoda validována (např. z důvodu nedostatečného lineárního rozsahu metody ve vysokých koncentracích), je nutné je ředit. Ředění nesmí ovlivnit přesnost a správnost metody. Diluční integrita se ověřuje pomocí vzorků, které byly připraveny o koncentraci analytu vyšší, než je horní limit kvantifikace (Upper limit of quantitation – ULOQ, obvykle nejvyšší kalibrační bod). Tyto vzorky jsou následně naředěny čistou maticí na úroveň odpovídající kalibrační křivce. Provádí se alespoň pět individuálních ředění a získané výsledky musí splňovat předepsané parametry (obvykle přesnost a správnost do 15 %). Diluční integrita by měla být ověřena v rozsahu koncentrací, které jsou očekávány u reálných vzorků [63].

Efekt matrice (Matrix effect)

V případě použití hmotnostního spektrometru by měl být ověřen také efekt matrice. K tomuto účelu se použije biologická matrice alespoň z šesti různých zdrojů (ideálně velmi rozdílná – například hemolytická, hyperlipidemická, z populace se změněnou funkcí jater nebo ledvin atd.). Pro každý analyt a IS se změří plocha jeho píku v dané matici a také v čistém rozpouštědle. Hodnotu matricového efektu získáme porovnáním těchto dvou ploch. IS normalizovaný matricový efekt se dále vypočítá vydělením matricového efektu analytu matricovým efektem vnitřního standardu. Variabilita IS normalizovaného efektu matrice by neměla přesáhnout 15 % [63].

3.4 Chelátory železa

3.4.1 Železo v lidském organismu

Železo je jedním z klíčových biogenních prvků. Existuje ve dvou oxidačních formách, mezi kterými dokáže za vhodných podmínek přecházet a umožňuje tak přenos elektronu (přechod mezi Fe^{2+} a Fe^{3+}). Z tohoto důvodu je železo naprosto nepostradatelné pro řadu funkcí lidského organismu, jako například transport kyslíku hemoglobinem nebo přenos elektronů v dýchacím řetězci. V lidském organismu ho nalezneme přibližně 4,0 až 4,5 gramu, což dostatečně pokrývá všechny jeho vitální funkce a zároveň poskytuje dostatečnou rezervu pro případ krátkodobého nedostatku [66-69].

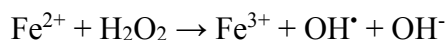
Fyziologický metabolismus železa

Většinu potřebného železa si tělo udržuje díky jeho recyklaci. Z přijímané potravy pak organismu stačí získat cca 5-10 % na pokrytí různých ztrát. Příjem Fe^{2+} probíhá pomocí aktivního transportu a je ovlivněn epiteliálními buňkami uvnitř zažívacího traktu (povrch tenkého střeva). Následně dochází k uskladnění železa ve střevních buňkách ve formě feritinu. Protein ferroproteín dále umožňuje přechod železa přes bazolaterální membránu enterocytů a jeho následný transport plasmou ve vazbě na transferin. Tímto způsobem se dostává na místa svého využití, kde je nezbytné při tvorbě enzymů a dalších klíčových funkcích, případně je opět uskladněno ve formě feritinu. Na rozdíl od absorpce je při transportu a skladování železo přítomné výhradně v oxidované formě Fe^{3+} . K jeho eliminaci z těla dochází v podstatě pouze vylučováním odumřelých enterocytů, případně krevními ztrátami, neboť lidský organismus není vybaven účinným mechanismem exkrece železa. [66, 69-71].

Narušení homeostázy železa

Je však nutné zdůraznit, že stejně jako nedostatek, může i přebytek železa působit vážné problémy. Není tedy překvapením, že za fyziologického stavu je v těle homeostáza železa precizně řízena řadou regulačních mechanismů, především pomocí skladovacích a transportních proteinů. Mnohé patologické stavy však vedou k narušení této rovnováhy. Největší riziko pak představuje volná (iontová) forma železa bez vazby na příslušný protein (tzv. Labile iron pool – LIP). Zmíněná schopnost přechodu železa mezi oxidovanou a

redukovanou formou se v případě nadbytku této volné frakce stává pro organismus zásadním problémem. Působením tzv. Fentonovy reakce totiž železo v redoxním prostředí umožňuje vznik vysoce reaktivních forem kyslíku (Reactive oxygen species – ROS) [68, 72-74].



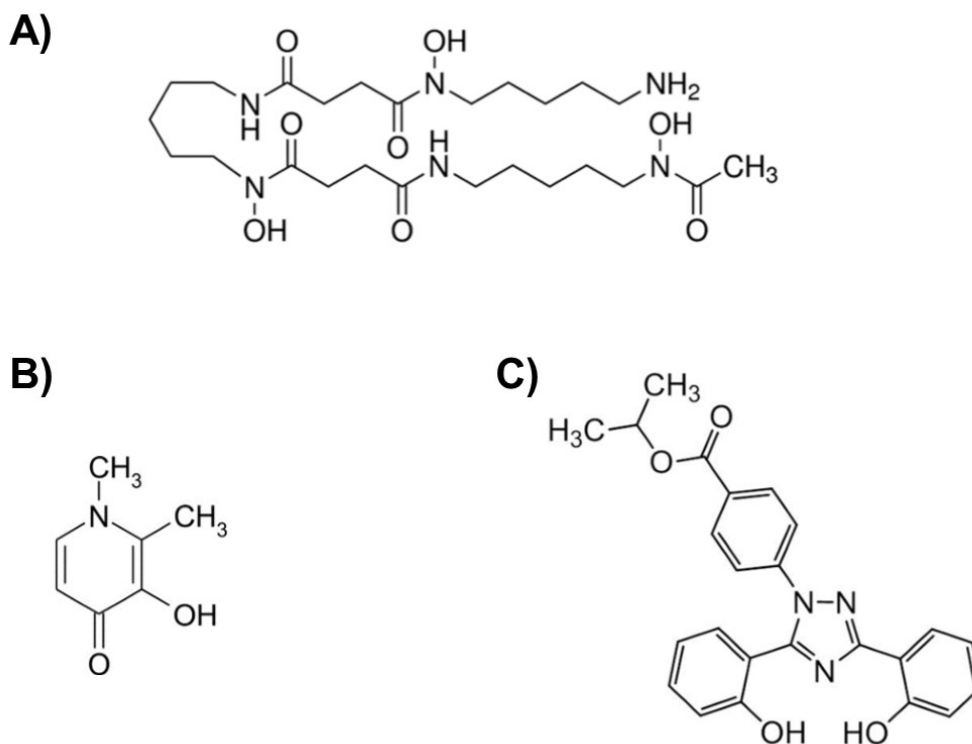
Vzniklý oxidační stres je lidský organismus schopen do určité míry tolerovat s využitím ochranných mechanismů, především působením řady antioxidantů. Je-li však tento kompenzační mechanismus přetížen, ROS narušují celou řadu klíčových buněčných struktur. Dochází k peroxidaci proteinů a lipoproteinů, hydroxylaci DNA, ale také k poškození buněčných membrán atd. Může dojít až k nezvratnému poškození a smrti buňky [68, 72, 75].

K nejčastějším poruchám rovnováhy železa řadíme tzv. přetížení organismu železem (iron overload). Lokální narušení homeostázy však může být spojeno s celou řadou dalších poruch a patologických jevů. Mezi ně patří ischemicko-reperfúzní poškození (srdeční tkáň), hemochromatóza a další [72, 75, 76].

3.4.2 Chelatační terapie

K odstranění železa (a případně dalších iontů) z organismu je možné využít tzv. chelatační terapie. Provádí se pomocí látek, tzv. chelátorů, které dokáží tvořit komplexy s ionty kovů. Ve formě komplexů je organismus schopen přebytečné železo vyloučit přirozenými exkrečními mechanismy – močí, stolicí a podobně. Kromě tvorby koordinačních vazeb jsou však pro biologické aplikace kladeny na chelátory železa vysoké nároky. Především je nutné, aby byly tyto látky co nejméně toxické (široký terapeutický index). Je třeba, aby vykazovaly dostatečnou lipofilitu pro průchod buněčnou membránou. Vzniklý komplex však nesmí být redoxně aktivní. V ideálním případě by pak chelátor měl být selektivní pro vybraný kov (zde železo), ale zároveň by měl co nejméně narušovat jeho fyziologické koncentrace. Splnění všech zmíněných podmínek je velmi složité, a proto je nezbytné volit určitý kompromis mezi požadovanými vlastnostmi [70, 71, 77].

Prvním klinicky využívaným chelátorem se stal deferoxamin (Obr. 1A). Toto léčivo je však poměrně málo lipofilní, má krátký biologický poločas a velmi špatně se vstřebává ze zažívacího traktu. Jeho nízká biologická dostupnost při perorálním podání vede k nutnosti podávat jej subkutánní infuzí, a to každých několik dní [77-79].



Obr. 1: Strukturní vzorce: **A)** deferoxamin, **B)** deferipron, **C)** deferasirox

Jednodušší a pohodlnější aplikaci přinesl vývoj lipofilnějších látek, které lze podat perorálně. Dílčím úspěchem se stal chelátor deferipron (Obr. 1B), který však významně ovlivňuje fyziologické koncentrace železa a také vykazuje nízkou selektivitu k železu. Proto následující výzkum směřoval k látkám, které by bylo možné podat perorálně, byly by selektivnější pro železo, ale nezasahovaly by příliš do jeho homeostázy [79-81].

Mezi poslední registrované biokompatibilní chelátory patří deferasirox (Obr. 1C). Je to málo toxická lipofilní látka s malou molekulou a dostatečně dlouhým biologickým poločasem umožňujícím perorální podávání jednou denně. Toto má velmi pozitivní vliv na compliance pacientů, což také zvyšuje praktickou použitelnost léčiva. Pro klinickou aplikaci ho schválila FDA již v roce 2005. Používá se především u pacientů s beta-talasemií (případně jinou chronickou anemií), kteří dostávají opakovaně krevní transfuze, a jsou tedy vystaveni zvýšenému přísunu železa. Dvě molekuly deferasiroxu vytváří s jedním iontem železa komplex, který může být následně snadno vyloučen z těla ven [82].

Výše popsané biokompatibilní chelátory byly původně vyvíjeny především k terapii přetížení organismu železem. Během let se však ukázalo, že železo hraje podstatnou roli také u celé řady jiných patologických dějů. Jeho oxido-redukční vlastnosti mohou mít vliv při

rozvoji neurodegenerativních chorob, aterosklerózy, ischemicko-reperfúzního poškození myokardu atd. Bylo však také zjištěno, že vychytávání železa by mohlo být prospěšné i v naprosto odlišných situacích, například v protinádorové léčbě. Rychle proliferující buňky mají mnohem vyšší metabolické nároky. Odstranění železa by tedy mělo zpomalit až zastavit jejich proliferaci. Mimo to redoxně aktivní komplexy tvoří ROS přímo uvnitř nádorových buněk, a tím mohou vést k jejich nevratnému poškození a usmrcení. Všechny tyto nové poznatky vedly k postupnému nárůstu zájmu o léčiva ze skupiny chelátorů železa a umožnily jejich současný rychlý rozvoj [73, 81, 83, 84].

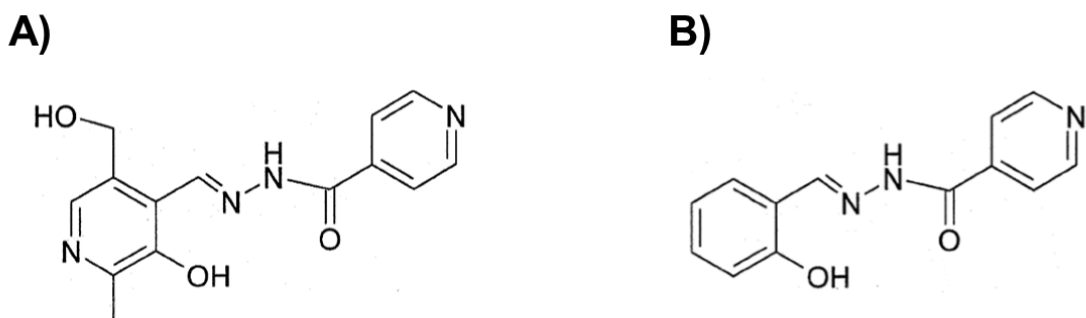
Vzhledem k tomu, že tyto potenciální aplikace chelatačních léčiv již nesouvisí s přetížením organismu železem, je nutné brát v úvahu podstatně vyšší riziko deplece železa a možné narušení vitálních funkcí na mnoha úrovních (transport kyslíku, funkce metaloenzymů atd.). Při vývoji chelátorů pro tyto indikace tedy musí být kladen zásadní důraz na jejich selektivitu a v ideálním případě zacílení účinku do místa potřeby bez ovlivnění homeostázy ve zbytku těla [76, 81].

3.4.3 Aroylhydrazonové chelátory

Aroylhydrazonové chelátory železa představují nadějnou a v současné době intenzivně studovanou skupinu potenciálních léčiv. Oproti deferoxaminu se jedná o lipofilnější molekuly, které jsou dobře tolerované a málo toxické. Studovány jsou především pro jejich antioxidační, cytoprotektivní, antiproliferativní nebo také antimikrobiální účinky [73, 80, 85, 86].

Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH)

PIH (Obr. 2A) je základní předlohou látkou této skupiny potenciálních léčiv. Svou pozornost získal díky výhodným biologickým vlastnostem – nízké toxicitě, afinitě k železu a vhodné lipofilitě pro průnik buněčnou membránou. Tento chelátor vytváří s trojmocným železem (Fe^{3+}) komplexy v poměru 2:1 díky uspořádání tří donorových atomů – kyslík karbonylové skupiny, dusík iminové skupiny a kyslík fenolové skupiny [87, 88].



Obr. 2: Strukturní vzorce: **A)** PIH, **B)** SIH

Po nadějných výsledcích *in vitro* a *in vivo* experimentů se však vývoj látky zastavil v první fázi klinických testů. Po podání do lidského organismu PIH neprokázal dostatečný účinek, což zřejmě souviselo s jeho nízkou biologickou dostupností po perorálním podání. To vedlo k vývoji nových aroylhydrazonových analogů s výhodnějšími vlastnostmi (stabilita, zacílení účinku apod.) [70, 85, 89].

Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH)

SIH (Obr. 2B) je novějším aroylhydrazonovým chelátorem odvozeným od PIH. Náhradou pyridoxalu salicylaldehydem bylo dosaženo dalšího zvýšení lipofility. Uvnitř buněk pak SIH účinně blokuje vznik ROS, čímž chrání buněčné struktury před oxidačním stresem. Vazba na železité ionty je dokonce silnější než u předložkové látky PIH. Stejně jako v případě PIH má tato molekula potenciál pro perorální podání díky dostatečné lipofilitě a malé molekulové hmotnosti [90, 91].

SIH disponuje širokým spektrem biologických účinků (cytoprotektivní, antioxidační působení atd.), které z něj udělaly vhodného kandidáta pro vývoj nových léčiv. V porovnání s deferasiroxem vykazuje podobný protektivní účinek proti oxidačnímu poškození srdečních buněk peroxidem vodíku, avšak při podstatně snížené toxicitě. *In vivo* byla na modelu chronické kardiotoxicity u králíka prokázána dobrá tolerance SIH po opakovaném podání a příznivý poměr antioxidačního a kardioprotektivního účinku a jeho toxicity [92, 93].

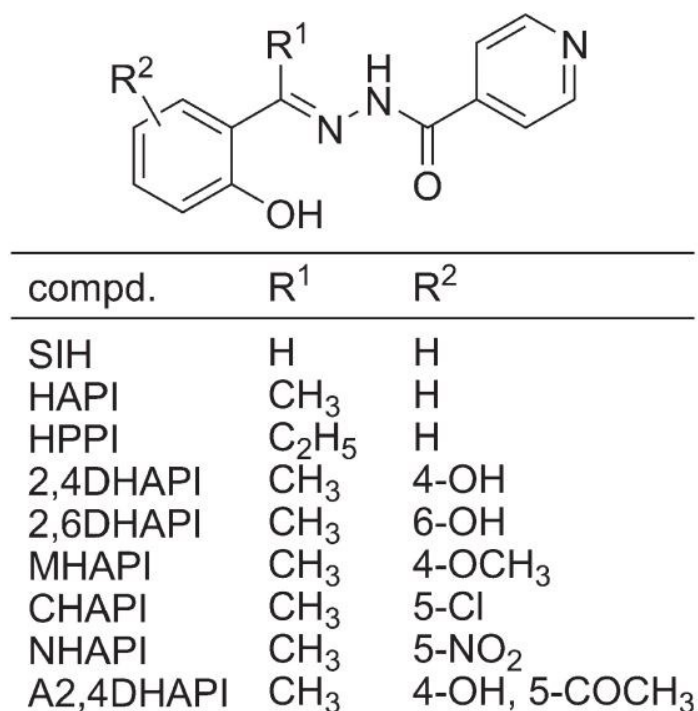
Kromě antioxidačního a cytoprotektivního působení vykazuje SIH také antiproliferativní, antimalarické a antituberkulotické účinky. Do určité míry byl dokonce pozorován jeho protektivní vliv vůči gama záření [72, 73, 80, 85, 94].

Hlavní nevýhodou této látky je však jeho krátký biologický poločas ($t_{1/2} = 18$ min u králíka), jež pravděpodobně souvisí s nízkou stabilitou hydrazonové vazby v biologickém

materiálu, zejména v plasmě. Proto byl další výzkum zaměřen do oblasti chemické modifikace struktury s cílem zlepšit stabilitu látky a optimalizovat její farmakokinetiku, a to při zachování nízké toxicity a srovnatelné biologické účinnosti. Z tohoto důvodu bylo v posledních letech syntetizováno velké množství nových analogů se řadou strukturních modifikací. Tyto změny vedly dvěma směry. Prvním bylo zvýšení chemické stability hydrazonové vazby, druhým pak syntéza proléčiv [73, 84, 85, 91].

Nové analogy SIH

V rámci strukturních modifikací s cílem zvýšit stabilitu hydrazonové vazby bylo nejprve testováno zavedení alkyly (methyl, ethyl) na spojovací řetězec vedle hydrazonové vazby. Tato úprava by měla zlepšit její sterickou ochranu. Dále bylo testováno zavedení hydroxy-, methoxy-, nitro- skupin a chloru na fenolický kruh za účelem ovlivnění elektronové hustoty v molekule (Obr. 3) [73, 95].



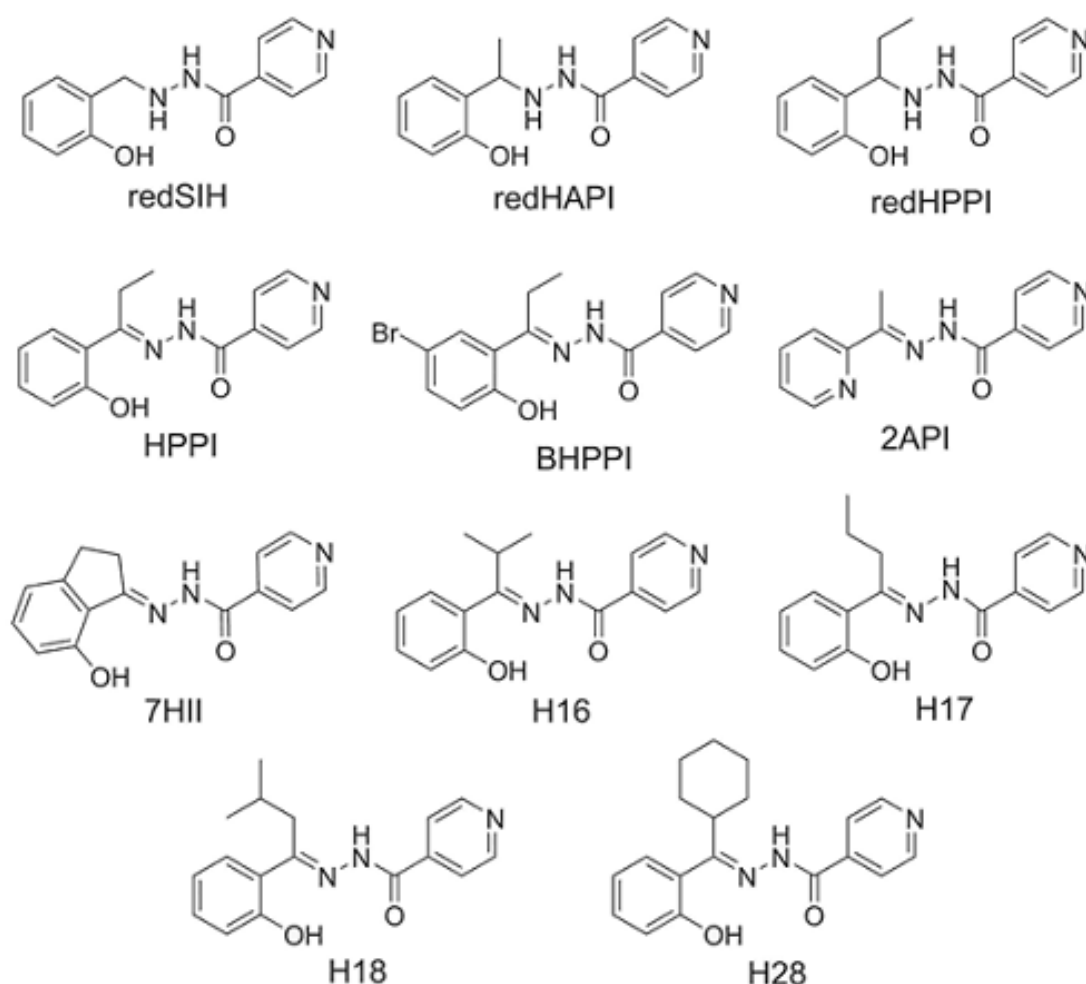
Obr. 3: Vybrané strukturní modifikace aroylhydrazonů

Ukázalo se, že stabilnější analogy mají nižší akutní toxicitu, ale při delších experimentech se jejich toxicita naopak zvyšuje. Tento jev by mohl být vysvětlen sníženou

produkcí toxických degradačních produktů v prvních fázích experimentů a zároveň způsobenou deplecí železa nerozloženými chelátory ve fázích pozdějších [73].

Jedním z nadějných analogů se ukázal být především HAPI (Obr. 3), který *in vitro* vykazuje silné antioxidační a cytoprotektivní účinky. Látka je poměrně stabilní v biologickém materiálu, což má zřejmě pozitivní vliv na akutní toxicitu (nízká produkce toxických rozkladných produktů). HAPI by mohl nalézt uplatnění zejména v indikacích vyžadujících krátkodobé podání léčiva (např. reperfuční poškození po infarktu myokardu). K dlouhodobé terapii je však spíše nevhodný vzhledem k nevyhnutelné depleci železa [73].

V rámci této práce byla studována stabilita a vybrané biologické vlastnosti pro další sérii nových aroylhydrazonů (Obr. 4):



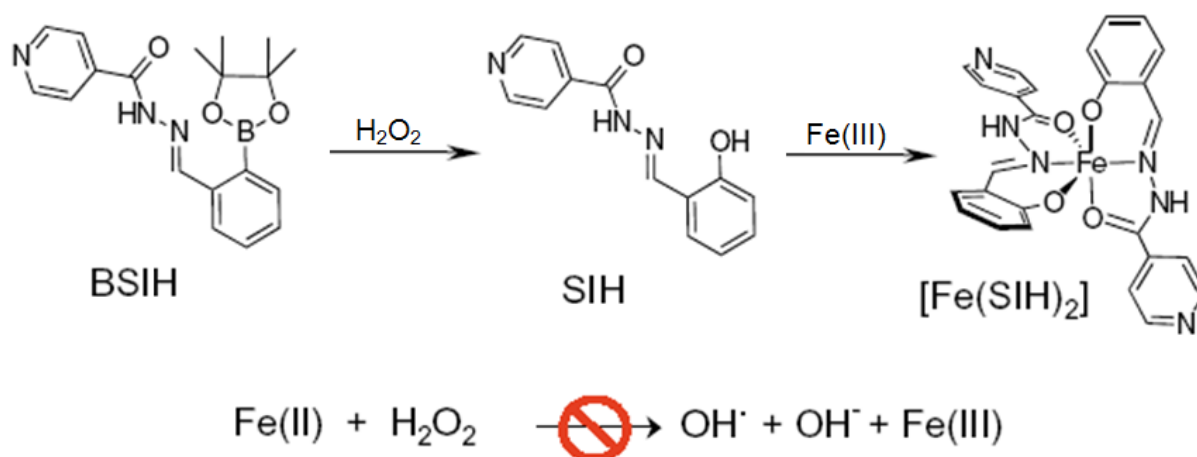
Obr. 4: Nové aroylhydrazony studované v rámci této práce

Proléčiva aroylhydrazonů

Bylo prokázáno, že prochelátory hodnocené v této práci nevykazují před aktivací téměř žádný chelatační účinek, což snižuje riziko jejich interference s metabolismem železa ve zbytku organismu. Provedené modifikace také umožňují zacílení efektu látek přímo do místa očekávaného účinku a snižují jejich dlouhodobou toxicitu [76, 96].

Boronyl salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (BSIH)

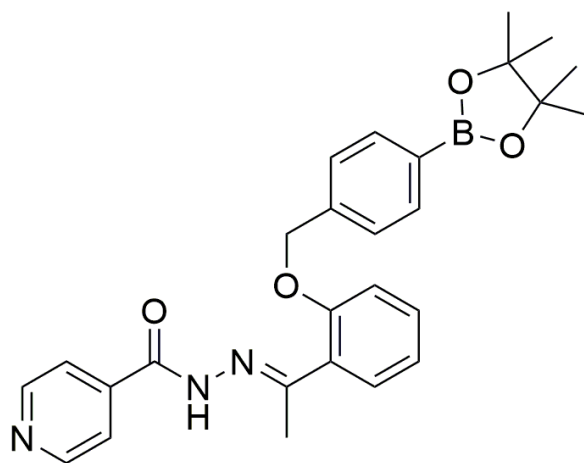
Velice zajímavou modifikaci SIH představuje látka s označením BSIH (Obr. 5). Jde o proléčivo, kde je fenolická skupina nahrazena heterocyklem, který je na benzenové jádro navázán esterovou vazbou přes atom boru (analog kyseliny borité). K vlastní aktivaci proléčiva dochází rozštěpením esterové vazby za uvolnění SIH, jenž je schopen efektivně vázat železité ionty a blokovat Fentonovu reakci (Obr. 5). Proces aktivace probíhá působením oxidačních činidel, například peroxidem vodíku nebo působením katecholaminů. Díky tomu dochází k zacílení účinku BSIH (resp. aktivního SIH) přímo do postižených míst. Ve zbytku těla k významné aktivaci látky nedochází. Zároveň bylo v jeho případě oproti předloze dosaženo zvýšení stability v buněčném médiu [76, 79].



Obr. 5: Schéma aktivace BSIH

Proléčivo BHAPI

Stejně jako v případě SIH bylo na základě chelátoru HAPI připraveno proléčivo – BHAPI (Obr. 6). Se zvýšenou stabilitou HAPI souvisí i jeho potenciálně delší působení v celém organismu, a tedy i vyšší riziko deplece železa. Proto je v tomto případě koncept proléčiva obzvláště vhodný [96].



Obr. 6: Strukturní vzorec BHAPI

HPLC analýza aroylhydrazonů

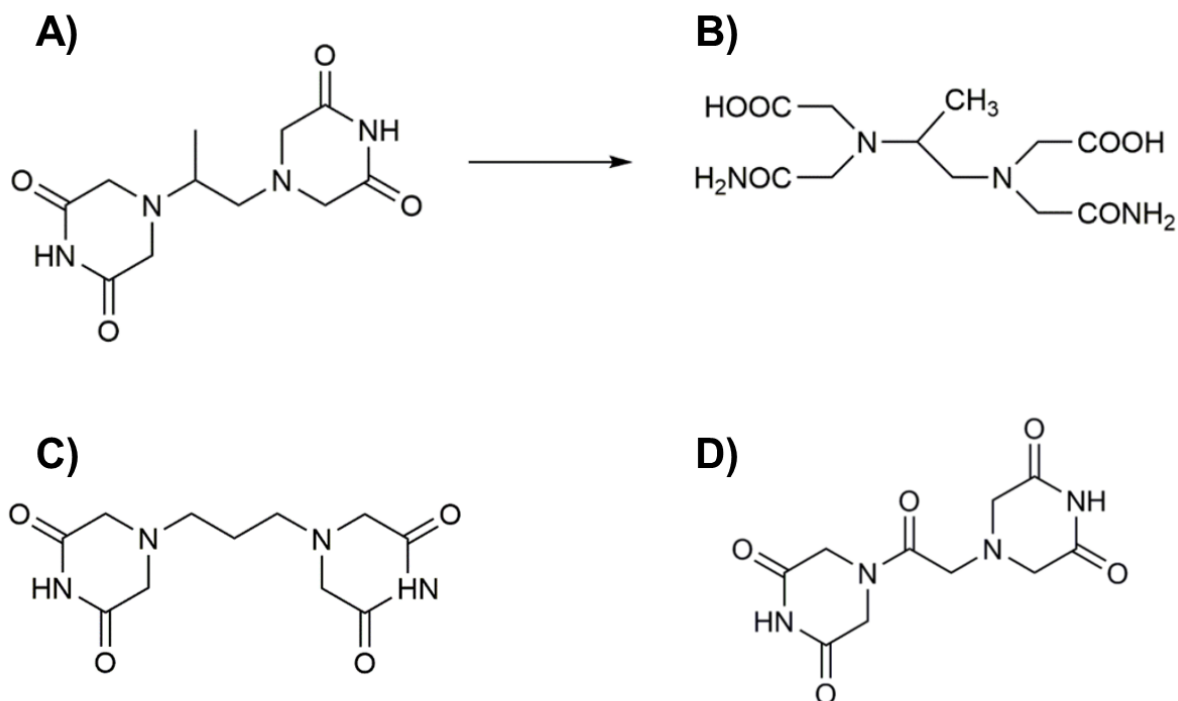
Aroylhydrazonové chelátory železa (PIH, SIH, látka s kódovým označením o-108) byly dosud s využitím HPLC analyzovány v pufrách a buněčných médiích, ale v menší míře také v plasmě. Separace byla prováděna na poměrně velkých kolonách (délka 25 cm, částice 5 μm) se sorbenty typu reverzních fází (C_{18} Nucleosil – Watrex, LiChrospher 100 – Merck). Použité mobilní fáze se skládaly převážně z fosfátového pufru s přídavkem EDTA a methanolu (někdy s přídavkem acetonitrilu). Při některých separacích PIH však bylo využito i iontově párového činidla (sodná sůl kyseliny 1-heptansulfonové). Během analýz pak bylo použito především UV detekce. Z aroylhydrazonových prochelátorů byl dosud pomocí HPLC (souběžně se vznikem této disertační práce) analyzován také BHAPI. V jeho případě byla použita analytická kolona Waters XBridge (opět délka 25 cm) a mobilní fáze složená z vody a acetonitrilu v gradientovém režimu. K detekci byl použit hmotnostní spektrometr. Separace však trvala 30 minut, což je pro rutinní použití poměrně nepraktické. Z výše uvedeného je tedy zřejmé, že ač se jedná o nadějnou skupinu potenciálních léčiv, zkušenosti s HPLC analýzou aroylhydrazonů a především jejich proléčiv jsou v současné době velmi omezené [85, 91, 96-98].

3.5 Dexrazoxan jako kardioprotektivum v protinádorové léčbě

Dexrazoxan (DEX, ICRF-187)

Národová onemocnění patří v dnešní době mezi nejzávažnější a nejobávanější patologické stavy. Současná léčba využívá především rychlého růstu nádorových buněk a zaměřuje se na prvky (poškození DNA, omezení přísunu živin atd.), jejichž zásah má největší dopad na rychle se množící buňky. Velice účinnou skupinou protinádorových léčiv jsou anthracyklinová cytostatika. Ta však vykazují značnou toxicitu, a proto je lze využít jen v omezeném množství. Použití vyšších dávek způsobuje nevratné poškození srdce spojené s následným srdečním selháním. Do určité míry lze tento nežádoucí účinek kompenzovat preventivní aplikací kardioprotektivní látky během terapie anthracykliny, která zmírní způsobené poškození [99-102].

Jediným léčivem používaným v klinické praxi za účelem ochrání myokardu před toxickými účinky anthracyklinů je bisdioxopiperazinový derivát dexrazoxan (Obr 7A). Přestože je k terapii využíván již několik let, jeho mechanismus účinku nebyl dosud přesně objasněn. Tento fakt značně komplikuje vývoj nových a účinnějších bisdioxopiperazinových kardioprotektiv [99, 103, 104].



Obr. 7: Strukturální vzorce: **A)** DEX, **B)** ADR-925, **C)** ICRF-161, **D)** JR-311

Obecně uznávaná teorie mechanismu působení považuje dexrazoxan za proléčivo, které je dostatečně lipofilní pro průnik biologickou membránou do místa účinku (kardiomyocyty), kde je transformován otevřením obou heterocyklů na aktivní formu – ADR-925 (Obr. 7B). Tento chelatačně aktivní produkt je pak schopen odnímat ionty železa z komplexu anthracyklin-železo, který je jinak značně redoxně aktivní a produkuje velké množství volných radikálů, které poškozují okolní tkáň. Chelatace tedy zabrání redoxnímu cyklení, vzniku radikálů a poškození myokardu [104-106].

Tuto teorii však v posledních letech zpochybnily výsledky řady studií, které prokázaly že: 1) Antioxidanty (například koenzym Q₁₀, N-acetylcystein, kyselina askorbová a další) nevykazují žádnou ochranu proti anthracykliny způsobené cytotoxicitě. 2) ADR-925 ani jiné chelátory nechrání kardiomyocyty proti anthracyklinům *in vitro*. 3) Strukturální analog dexrazoxanu ICRF-161 (Obr. 7C) nechrání buňky ani navzdory faktu, že je schopen poskytnout chelatačně aktivní produkt bioaktivace podobný ADR-925 [99, 107].

Nejnovější poznatky tedy naznačují, že mechanismus kardioprotekce DEX je komplexnější a že významnou roli bude hrát spíše účinek parentní látky. V tomto ohledu je nejčastěji diskutována a studována inhibice topoizomerázy II (TOP2), konkrétně její beta isoformy (TOP2B). Tuto teorii podporují především zjištění, že i jiné inhibitory TOP2 (např. merbaron) chrání kardiomyocyty proti anthracykliny indukované kardiotoxicitě a také že srdeční selhání nebylo pozorováno po podání doxorubicinu myším se selektivní delecí genu kódujícího TOP2B v kardiomyocytech [99, 108-111].

Ačkoliv výsledky nejnovějších studií naznačují kardioprotektivní působení dexrazoxanu prostřednictvím deplece TOP2B, pochopení tohoto mechanismu vyžaduje komplexní studium metabolismu a bioaktivace léčiva *in vivo*, zejména pak v místě účinku. Prozatím byl však popsán pouze farmakokinetický profil DEX [112-115].

Pro zasazení významu metabolismu pro kardioprotekci DEX do širšího kontextu je taktéž potřeba studovat současně farmakokinetiku DEX a jeho metabolitu. To je však značně komplikováno složitostí analýzy těchto látek v biologickém materiálu. Látky totiž není možné analyzovat s využitím UV detekce pro jejich nedostatečnou absorpční vlnovou délku. V minulosti bylo publikováno stanovení DEX za použití UV detekce při vlnové délce kolem 205 nm. Nicméně tato vlnová délka je pro stanovení v biologickém materiálu málo selektivní a umožňuje stanovení pouze relativně vysokých koncentrací. ADR-925 pak bylo chromatograficky analyzováno v komplexu s terbiem s využitím fluorescenční detekce (excitační vlnová délka 200 nm, emisní 544 nm), což je z pohledu současné farmaceutické analýzy nepraktické. K detekci lze totiž s výhodou použít hmotnostní spektrometr. Dalším

problémem je pak velký rozdíl v lipofilitě parentní látky a jejího metabolitu – ADR-925, který je vysoce hydrofilní, a je tedy špatně zadržován na běžných reverzních fázích. Analýzu komplikuje i výrazná chelatační aktivita ADR-925. Pokud není chromatografický systém předem zbaven iontů kovů, dochází ke vzniku komplexů a k následnému zhoršení reprodukovatelnosti a detekčního limitu metody [116-118].

S absencí znalostí o přesném mechanismu kardioprotektivního působení DEX souvisí také nedostatek informací o vztahu struktura-kardioprotektivní aktivita v celé bisdioxopiperazinové skupině potenciálních léčiv. S cílem objasnit tento vztah byla připravena celá skupina analogů DEX i ADR-925 a byly podrobeny studiu *in vitro*, případně *in vivo*. Bylo zjištěno, že analogy ADR-925 nevykazují na modelu anthracyklinové toxicity významný protektivní účinek. V případě analogů parentního léčiva se jeví jako nadějná obměna spojovacího řetězce bisdioxopiperazinových cyklů. Tímto způsobem byl připraven analog s označením JR-311, tedy 4,4'-(1-oxoethan-1,2-diyl)bis(piperazin-2,6-dion) (Obr. 7D), který byl vybrán pro bioanalytické hodnocení [99, 105, 119].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

(KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACÍM)

4.1 Analytické hodnocení nových aroylhydrazonů a jejich proléčiv v biologickém materiálu

Aroylhydrazony patří mezi nadějná potenciální léčiva s širokou škálou možných aplikací. Vykazují řadu biologických účinků (antioxidační, antiproliferativní a cytoprotektivní) při relativně nízké toxicitě. Jejich největší nevýhodou je však krátký biologický poločas, který souvisí s rychlým štěpením hydrazonové vazby v biologickém materiálu.

Ve snaze o zvýšení stability byla syntetizována řada strukturních analogů odvozených od předlokové struktury (SIH) a bylo testováno jejich vybrané biologické působení. Cílem studie bylo přispět k objasnění vztahu struktura-aktivita v této skupině, což je základním předpokladem pro budoucí cílený vývoj aroylhydrazonových léčiv (**Práce č. 1**).

Mezi testované chemické modifikace struktury patřily: 1) redukce hydrazonové vazby látek SIH a jeho derivátů HAPI a HPPI s cílem zhodnotit význam vazby pro biologickou aktivitu látek, 2) bromace fenolického kruhu HAPI a HPPI v poloze 5, protože substituce chlorem prokázala v předchozí studii zvýšení cytotoxicity, 3) náhrada fenolického kruhu HAPI za pyridinový heterocyklus (byla testována pro záměnu atomů účastnících se chelatace – O, N, O za N, N, O). Nakonec byly připraveny 4) aroylhydrazony odvozené od HAPI a HPPI s různými alkylovými (propyl, isopropyl, isobutyl, cyklohexyl) skupinami sousedícími s hydrazonovou vazbou a 5) analog HAPI, u nějž se připojený alkyl stal součástí indanového kruhu.

U připravených látek byla testována stabilita v plasmě, chelatační účinnost, redoxní aktivita a schopnost protekce vůči oxidačnímu stresu navozenému peroxidem vodíku. Dále pak cytotoxický efekt na buňky prsního adenokarcinomu (MCF-7) a kardiomyoblasty (H9c2) s cílem zjistit selektivitu cytotoxického účinku.

Stabilita nových analogů SIH v plasmě *in vitro* byla hodnocena s využitím chromatografického systému Prominence LC 20A (Shimadzu) s UV nebo DAD detektorem. Pro analýzu nových chelátorů bylo testováno několik kolon. Z hlediska separace a tvaru píků se jako nejvhodnější ukázala kolona Ascentis C18 (100x3 mm, 3 μ m) chráněná předkolonou stejného typu. Při hodnocení jednotlivých látek byly využity různé poměry mobilní fáze složené z 1 mM EDTA v 5 mM fosfátového pufru a methanolu tak, aby byla zachována dostatečná separace analytů, vnitřních standardů a balastů z matrice. Pro každý analog byly chromatografické podmínky optimalizovány. Přídavek EDTA byl nezbytný pro zachování

reprodukovatelných výsledků analýz chelátorů. Detekce probíhala při vlnové délce v oblasti maxima absorpance analytů (254 a 297 nm). Vzorky plasmy byly precipitovány methanolem. V případě některých látek bylo nutné po úpravě vzorku získaný roztok naředit deionizovanou vodou v poměru 1:1, aby byly zachovány ostré tvary píků. Metody stanovení každého z nových analytů byly validovány ověřením vybraných validačních parametřů – selektivita, přesnost, správnost a linearita v koncentračním rozmezí 5-100 μM .

V rámci stabilitní studie bylo prokázáno, že redukce hydrazonové vazby značně zvyšuje stabilitu v případě redSIH (zůstalo 30 % původní koncentrace na konci experimentu – 600 min), ale naopak ji snižuje v případě redHAPI a redHPPI (detekováno 23 a 25 % původních koncentrací na konci experimentu). Zavedení isopropylu a cyklohexylu do spojovacího řetězce mělo za následek kompletní rozklad analytů již během 180 minut experimentu. Naopak pozitivní vliv na stabilitu byl zjištěn při zavedení nerozvětveného propylu a isobutylu (detekováno 60 a 69 % na konci experimentu) do sousedství hydrazonové vazby a také bromace fenylového cyklu.

V této práci bylo určeno několik strukturních parametrů klíčových pro aroylhydrazonové chelátory železa a jejich budoucí vývoj. Bylo zjištěno, že: 1) hydrazonová vazba je nezbytná pro chelatační aktivitu těchto látek, 2) bromace fenylového kruhu vede ke snížení selektivity cytotoxického účinku, 3) záměna fenolického kyslíku za pyridinový dusík vede taktéž ke snížení selektivity toxicity látky, 4) zavedení krátkého alkyly do blízkosti hydrazonové vazby je naopak vhodnou modifikací z pohledu zvýšení stability a protinádorového působení. Takto byly alkylovány analogy H17 (propyl) a H18 (isobutyl), které při hodnocení dosáhly nejlepších výsledků. Vzhledem ke zvýšené stabilitě a dobré selektivitě vůči studovaným nádorovým buňkám si tyto látky zaslouží pozornost při dalším vývoji této nadějně skupiny potenciálních léčiv.

Kromě nízké stability v biologickém materiálu však může být potenciální nevýhodou aroylhydrazonů také silná chelatační aktivita. S tou je spojeno vyšší riziko toxicity při dlouhodobém podání v důsledku ovlivnění fyziologických koncentrací železa. Jedním z řešení by mohlo být zacílením účinku pomocí prochelátorů. Jako první byl připraven prochelátor odvozený od SIH – BSIH, který je aktivován až v přítomnosti oxidačního stresu.

V rámci dalšího vývoje bylo třeba charakterizovat vybrané biologické vlastnosti BSIH, zejména jeho aktivaci *in vitro* a také jeho základní farmakokinetické parametry *in vivo* (**Práce č. 2**). K tomuto účelu byly vyvinuty a validovány dvě nové analytické metody (LC-UV a LC-MS) umožňující současné stanovení koncentrací SIH a BSIH v relevantních biologických materiálech. Hned v počátku vývoje metod bylo zjištěno, že BSIH ve vodném

prostředí téměř okamžitě odštěpuje pinakol z chránicí skupiny za vzniku esteru borité kyseliny a SIH (tzv. BASIH). Proto není možné BSIH analyzovat v jeho původní formě, ale pouze jako BASIH. Ten je však stále proléčivem aktivovatelným peroxidem vodíku a nijak nezhoršuje vlastnosti prochelátoru BSIH. Má ale podstatně nižší lipofilitu, a tím pádem i kratší retenční čas.

Nejprve byla vyvíjena LC-UV metoda, která by byla vhodná pro studium aktivace BSIH na jeho aktivní formu – SIH pomocí peroxidu vodíku a ke studiu stability těchto látek *in vitro* (ADS pufr a DMEM buněčné médium). Pro analýzy byl použit stejný HPLC systém jako v případě analýz nových analogů SIH. Při vývoji chromatografických podmínek byla v návaznosti na předchozí práci nejprve testována kolona Ascentis C18. Avšak v tomto případě nebylo možné na této koloně získat symetrický pík BSIH (BASIH). Proto byla následně využita kolona Zorbax Bonus-RP (150x3 mm, 3.5 μ m) chráněná předkolonou stejného typu. Tato kolona je obzvláště vhodná pro analýzu látek s rozdílnou polaritou a umožnila snížení rozdílu retenčních časů hodnocených analytů a zkrácení času analýzy na přijatelnou hodnotu. Jako vodná složka mobilní fáze byla použita 2 mM EDTA v 7 mM fosfátovém pufru, jejíž pH bylo upraveno na hodnotu 6,0 hydroxidem sodným, což bylo nezbytné pro dosažení symetrického píku BSIH. Vyšší hodnoty pH mobilní fáze vedly ke koeluci BSIH a složek buněčného média. Organická část mobilní fáze byla tvořena směsí methanol a acetonitril v poměru 40:60 (v/v). Pokus o její zjednodušení a nahrazení čistým acetonitrilem vedl sice ke zlepšení tvaru piků, ale také k částečné koeluci BSIH a balastů buněčného média. Vlnová délka UV detekce 297 nm byla zvolena s ohledem na absorpční maxima hodnocených látek. Vzorok ADS a DMEM byly před analýzou ředěny methanolem. Metoda byla validována dle směrnice FDA [62]. Linearita byla prokázána v rozmezí 4-115 μ M pro SIH a 7-115 μ M pro BSIH v ADS pufru i buněčném médiu. Dále byla ověřena stabilita analytů, selektivita, přesnost a správnost metody.

Vyvinuté chromatografické podmínky byly dále modifikovány tak, aby byly kompatibilní s MS detekcí, s cílem studovat stabilitu SIH a BSIH v plasmě a stanovit základní farmakokinetické parametry BSIH u potkana. LC-MS analýzy byly provedeny s využitím hmotnostního detektoru typu iontové pasti – LCQ Advantage Max (Thermo Finnigan). Fosfátový pufr a EDTA z mobilní fáze bylo nutné nahradit netěkavými komponenty. V tomto případě byl použit 2 mM mravenčan amonný bez úpravy pH. Vyřazení EDTA jako složky mobilní fáze však bylo nezbytné pro zachování akceptovatelné reprodukovatelnosti metody kompenzovat důkladným promytím celého systému a kolony pomocí 2 mM roztoku EDTA před vlastní analýzou. K detekci bylo využito SRM přechodů pro zajištění maximální

selektivity metody. Vzorky plasmy byly před MS analýzou precipitovány methanolem. Stejně jako LC-UV byla i tato metoda validována dle směrnice FDA, avšak v koncentračním rozmezí 0,24-23 μM pro SIH a 0,06-23 μM pro BSIH. V případě LC-MS metody byla navíc hodnocena extrakční výtěžnost, matricový efekt a diluční integrita.

Bylo potvrzeno, že obě látky jsou stabilní v ADS pufru a BSIH je významně stabilnější oproti SIH také v DMEM médiu. Po 24 hodinové inkubaci BSIH v médiu bylo stále detekováno 85 % jeho původní koncentrace. Naopak v případě SIH bylo detekováno méně než 50 % jeho původní koncentrace již v šesté hodině experimentu. Také bylo zjištěno, že BSIH je peroxidem vodíku rychle aktivován na SIH. Tato konverze však není ekvimolární a vzniká pouze cca 25 % očekávaného množství SIH. Zbylý BSIH se zřejmě rozkládá na jiné degradační produkty. BSIH prokázal také významně vyšší stabilitu v plasmě *in vitro* a delší biologický poločas ($t_{0,5} = 69$ min) v porovnání se SIH ($t_{0,5} = 18$ min). Je však nutné brát v úvahu, že se jedná o pilotní data, neboť základní farmakokinetické parametry BSIH byly stanoveny u potkana na rozdíl od SIH, jehož farmakokinetika byla studována u králíka [91]. Výsledky mohou tedy být zatíženy mezidruhovou variabilitou.

Zjištění, že konverze BSIH na SIH není ekvimolární, poukázalo na nutnost bližšího studia rozkladného procesu BSIH. Pozornost byla zaměřena zejména na detekci a kvantifikaci dalších možných rozkladných produktů a hodnocení efektu srdečních buněk (H9c2) na tento proces. Dále bylo třeba charakterizovat vybrané biologické vlastnosti rozkladných produktů. Pozornost byla zaměřena na isoniazid, salicylaldehyd a jejich oxidační produkty – kyselinu salicylovou a pyrokatechol (**Práce č. 3**).

Za tímto účelem byla upravena HPLC-UV metoda použitá v předchozí fázi práce pro analýzu SIH a BSIH. Vzhledem k většímu množství hodnocených látek však bylo nutné optimalizovat chromatografické podmínky, aby nedocházelo ke koeluci žádného ze sledovaných analytů. Bylo zvýšeno pH vodné složky mobilní fáze na 7,0 pro zlepšení tvaru píků (především BSIH) a složení organické části bylo modifikováno na methanol a acetonitril v poměru 30:70 (*v/v*). Navzdory provedeným úpravám nebylo možné separovat všechny analyty na základní linii za isokratických podmínek. Proto byl použit gradient, což však mělo za následek prodloužení analýzy vzhledem k nutnosti ustálení kolony po provedení každé separace. K detekci byly vzhledem k absorpčním maximům použity dvě vlnové délky – 254 nm pro salicylaldehyd a 297 nm pro všechny ostatní analyty. LC-UV metoda byla validována dle směrnice FDA v koncentračním rozsahu 2,5-100 μM pro SIH a salicylaldehyd a v rozsahu 5-100 μM pro BSIH a salicylovou kyselinu. Byla hodnocena linearita, selektivita, přesnost a správnost. Pyrokatechol nebyl v žádném z pilotních experimentů detekován, proto

pro jeho stanovení nebyla metoda validována. Isoniazid nebylo možné stanovit vzhledem k jeho koeluci s balasty z DMEM media, kterou se nepodařilo odstranit.

Díky úpravě LC-UV metody byla v buněčném médiu při aktivaci BSIH působením peroxidu vodíku (kromě vznikajícího SIH) detekována především vysoká koncentrace salicylaldehydu. Ani v tomto případě se však nejednalo o množství ekvimolární k rozkladu BSIH. Toto zjištění je možné vysvětlit vysokou těkavostí salicylaldehydu, což bylo potvrzeno porovnáním výsledků stabilitních experimentů provedených v uzavřené a otevřené nádobě. Působení peroxidu vodíku nemělo na rozklad SIH a salicylaldehydu žádný vliv. V přítomnosti H9c2 buněk však docházelo k rychlejšímu poklesu koncentrace SIH, BSIH i salicylaldehydu. Zásadní vliv pak měla přítomnost buněk překvapivě při inkubaci s BSIH a peroxidem vodíku. Oproti experimentu bez buněk se v tomto případě aktivace dramaticky zpomalila, což pravděpodobně souvisí s metabolizací peroxidu buňkami.

BSIH, isoniazid a salicylová kyselina vykázaly v testovaných koncentracích na rozdíl od SIH a salicylaldehydu nulovou toxicitu. U BSIH i degradačních produktů byl dále hodnocen jejich chelatační potenciál a protektivní účinek proti oxidačnímu stresu způsobenému peroxidem vodíku. Bylo zjištěno, že BSIH nevykazuje (před aktivací peroxidem vodíku) žádnou chelatační aktivitu. Salicylaldehyd naopak vykázal cca 50 % chelatační aktivity stanovené pro SIH. To se však jeví jako relativně výhodné vzhledem k faktu, že při aktivaci BSIH vzniká společně se SIH také salicylaldehyd, a může se tedy podílet na výsledném celkovém účinku.

Tato studie prokázala, že je BSIH v biologickém materiálu významně stabilnější v porovnání se SIH, vykazuje nízkou toxicitu a není chelatačně účinný. Sníženou toxicitu lze vysvětlit nižším uvolňováním toxických degradačních produktů díky zvýšené stabilitě. Pozitivní vliv má v tomto ohledu pravděpodobně i absence chelatační aktivity. Z tohoto důvodu BSIH nezpůsobí depleci železa ani při delší expozici. Vedle SIH vzniká jeho aktivací v médiu také salicylaldehyd, který je taktéž chelatačně aktivní a mohl by se spolupodílet na výsledném antioxidačním a cytoprotektivním účinku léčiva. BSIH by tedy mohl být vhodný vzor pro nové strukturní modifikace aroylhydrazonových proléčiv.

Vedle BSIH bylo připraveno také proléčivo BHAPI, odvozené od jednoho z novějších aroylhydrazonových analogů – HAPI. Ten vykazuje v porovnání se SIH významně vyšší stabilitu při srovnatelné biologické účinnosti. V tomto případě byla zaměřena pozornost na studium potenciálu HAPI a zejména BHAPI v ochraně tkání (například myokardu) před toxickým vlivem katecholaminů a ROS vzniklých v důsledku jejich působení **(Práce č. 4)**.

Konkrétními cíli práce proto bylo: 1) studovat schopnost katecholaminů a jejich oxidačních produktů aktivovat BHAPI, 2) stanovit schopnost HAPI a BHAPI pronikat do buněk a vázat zde volné železo, 3) zhodnotit protektivní účinek obou látek proti toxicitě způsobené katecholaminy a jejich oxidačními produkty, 4) ověřit vlastní toxicitu obou látek a jejich schopnost snižovat množství produkovaných ROS.

Pro studium stability HAPI a BHAPI, ale také aktivace BHAPI pomocí epinefrinu (EPI) a jeho oxidované formy (oxEPI) v ADS pufru a buněčném médiu *in vitro* bylo potřebné optimalizovat chromatografické podmínky. Při analýze bylo nutné separovat píky balastů buněčného média, HAPI a dva izomery BHAPI. Vývoj chromatografických podmínek vycházel z úvodní práce tohoto bloku. Bylo však modifikováno složení mobilní fáze. Separace bylo dosaženo s použitím 15 mM fosfátového pufru a acetonitrilu. V případě analýzy HAPI a BHAPI nebylo nutné přidávat EDTA do mobilní fáze. Pro zachování reprodukovatelnosti analýz postačilo promytí kolony a chromatografického systému pomocí 2 mM EDTA před sérií analýz a následná ekvilibrace kolony mobilní fází. Pro dosažení úplné separace izomerů BHAPI bylo opět nutné použít gradient. Detekce analytů proběhla s ohledem na absorpční maxima látek – 270 nm pro BHAPI a 283 nm pro HAPI. Odebrané vzorky buněčného média a ADS pufru byly před analýzou ředěny acetonitrem v poměru 1:1. Dle směrnice FDA byla ověřena selektivita, přesnost a správnost metody. Linearita byla prokázána v rozmezí 1-100 μ M pro oba analyty v ADS pufru i buněčném médiu.

V této práci bylo zjištěno, že HAPI byl schopný snížit produkci ROS zprostředkovanou působením katecholaminů a signifikantně zredukovat kardiotoxicitu oxidačních produktů katecholaminů. Byla potvrzena dobrá chelatační účinnost HAPI a jeho relativně nízká toxicita po 24 hodinovém experimentu. Na druhou stranu, toxicita HAPI se značně zvyšuje po 72 hodinách, což pravděpodobně souvisí s deplecí pro buňky potřebného železa. Tomuto jevu lze však předejít použitím prochelátoru, což jsme potvrdili ověřením nižší toxicity BHAPI po 72 hodinách experimentu. Taktéž BHAPI prokázal významné snížení produkce toxických produktů katecholaminů a protekci proti poškození srdečních buněk oxidovanými katecholaminy, a to téměř stejně účinně jako HAPI. Zároveň však nebyl schopen chelatace před aktivací pomocí ROS.

S využitím LC-UV metody bylo zjištěno, že: 1) HAPI i BHAPI jsou poměrně stabilní v pufru i v buněčném médiu, 2) BHAPI je po vystavení účinkům katecholaminům v buněčném médiu kompletně rozložen (aktivován) během 7 hodin, 3) při aktivaci vzniká téměř ekvimolární množství HAPI. Mírný pokles jeho očekávané koncentrace byl pravděpodobně ovlivněn vlastní stabilitou HAPI. Proces aktivace byl však výrazně zpomalen

v buněčném médiu v přítomnosti buněk. Tento jev může být vysvětlen působením buněčných antioxidačních mechanismů.

Během práce byl potvrzen vliv volného buněčného železa na oxidaci a kardiotoxicitu katecholaminů a schopnost HAPI a BHAPI tomuto procesu bránit. Byly popsány výhodné biologické vlastnosti jak HAPI, tak BHAPI. Na rozdíl od konverze BSIH na SIH je aktivace BHAPI velice efektivní a jejím produktem je primárně HAPI. Z těchto důvodů lze doporučit obě látky k dalšímu studiu a případným *in vivo* experimentům.

4.2 Analytické hodnocení dexrazoxanu a jeho analogů

Dexrazoxan je v současné době jediným klinicky užívaným léčivem, které chrání myokard před poškozením během cytostatické terapie anthracykliny. Mechanismus účinku DEX však stále není plně objasněn. Pro objasnění tohoto mechanismu je potřeba získat informace o osudu DEX v organismu, zejména pak v místě účinku (v srdci a srdečních buňkách). Získaná data pak dále umožní korelovat vztah mezi farmakokinetikou a farmakodynamikou. Tato práce byla zaměřena na detailní studium farmakokinetiky a metabolismu DEX *in vitro* i *in vivo* za podmínek, kdy léčivo působí kardioprotektivně (Práce č. 5).

Pro stanovení koncentrací DEX a jeho metabolitu ADR-925 v biologickém materiálu byla využita LC-MS metoda vyvinutá v naší výzkumné skupině v minulosti pro analýzu buněčného média a srdečních buněk [117]. V rámci této práce byla metoda zvalidována dle směrnice FDA pro stanovení obou analytů v ADS pufru a buněčném médiu (oba analyty 8-100 μM), buňkách (DEX 4-80 pmol/ 10^6 buněk; ADR-925 7-70 pmol/ 10^6 buněk) plasmě (DEX 2-340 μM ; ADR-925 1-100 μM), moči (oba analyty 15-1500 μM) a tkáních (DEX 3,7-200 nmol/g; ADR-925 1,6-16 nmol/g vlhké tkáně).

Byl použit chromatografický systém Shimadzu Prominence LC 20A on-line propojený s hmotnostním spektrometrem typu iontové pasti – LCQ Advantage Max. Separace byly provedeny na chromatografické koloně Synergi Polar-RP (150x3 mm, 4 μm) za využití mobilní fáze složené z 5% MeOH v 2 mM mravenčanu amonném (složka A) a methanolu (složka B). Při separaci bylo nutné využít gradientového módu. Abychom zabránili vzniku komplexů chelatačně aktivního ADR-925 na koloně a následné ztrátě citlivosti a reprodukovatelnosti metody, byl systém před analýzou důkladně promyt roztokem 2 mM EDTA a následně v něm byla ustálena mobilní fáze. K detekci analytů byl využit SRM mód pro zachování vysoké selektivity metody.

Metoda byla použita pro analýzu vzorků neonatálních potkaních kardiomyocytů (neonatal ventricular cardiomyocytes – NVCM) a buněčného média po inkubaci s DEX a ADR-925 a pro analýzu vzorků odebraných po aplikaci DEX a ADR králíkům (60 mg/kg, *i.p.* nebo 30 min *i.v.* infuze).

V předložené studii bylo zjištěno, že v buněčném médiu za přítomnosti NVCM buněk klesá koncentrace DEX po 24 hodinách přibližně na 30 % původní hodnoty. Téměř totožný rozklad byl zaznamenán v médiu bez NVCM buněk, což naznačuje, že za rozklad

DEX na ADR-925 je zodpovědná spíše spontánní hydrolýza než metabolická aktivita buněk. ADR-925 byl v buněčném médiu stabilní.

Po inkubaci s DEX byl uvnitř buněk detekován jak DEX, tak metabolit ADR-925. V případě inkubace NVCM buněk se samotným ADR-925 byly v buňkách detekovány dokonce vyšší koncentrace metabolitu než po inkubaci s DEX. Metabolit tedy zjevně může prostupovat do buněk sám o sobě, což vyvrací teorii, že by ADR-925 nepronikalo buněčnou membránou [107]. Aby bylo možné objasnit mechanismus průchodu ADR-925 membránou, byl průchod testován při několika koncentracích látky a různých teplotách. Pokles prostupnosti při 4 °C poukazuje na roli aktivního transportéru. Na druhou stranu nebyl pozorován stropový efekt ani při koncentraci 1000 µM metabolitu. Při koncentracích použitých v experimentu tedy transport nebyl plně nasycen.

Na základě profilu koncentrací DEX a ADR v plasmě stanovených po aplikaci DEX králíkům byly vypočítány populační farmakokinetické parametry. Míra exkrece léčiva byla vypočítána na základě stanovení koncentrací obou látek v moči. V analyzovaných tkáních byl stanoven profil koncentrací obou látek v časech (0,5, 3, 6 a 12 h). Stejný experiment byl proveden pro ADR-925. Bylo zjištěno, že základní farmakokinetické parametry DEX v této studii u králíka jsou podobné parametrům pozorovaným v klinických studiích. To naznačuje, že použitý model je vhodný pro studium metabolismu DEX a ADR-925 a získaná data odpovídají teoretickým hodnotám u člověka.

Stanovené koncentrace DEX v myokardu a játrech byly téměř dvojnásobné oproti kosternímu svalu, což by mohlo být vysvětleno rozdílným prokrvením těchto tkání. Postupný pokles koncentrace DEX v tkáních nebyl doprovázen očekávaným nárůstem koncentrací ADR-925. Metabolit tedy zřejmě nevzniká a nekumuluje se díky své hydrofilítě v tkáních, jak předpokládala dřívější teorie [103, 106]. Koncentrace DEX v plasmě a tkáních mezi sebou velmi dobře korelovaly, avšak v případě ADR-925 tomu bylo naopak. Dále bylo zjištěno, že hlavní cestou exkrece ADR-925 je renální vyloučení v nezměněné formě.

V posledním kroku studie byly oba analyty inkubovány s jaterními a srdečními homogenáty, v plasmě a v ADS pufu *in vitro* za účelem ověření přímého vlivu metabolismu v tkáních na rozklad obou látek. V případě myokardu došlo pouze k nízkému úbytku DEX po 6 hodinách a množství srdeční tkáně v homogenátu nemělo významný vliv. Naproti tomu v játrech probíhal rozklad rychleji a byl závislý na množství použité jaterní tkáně. Je tedy zřejmé, že se biotransformace DEX účastní některé jaterní enzymy. Taktéž v králíčí plasmě se DEX přeměnil na metabolit podstatně rychleji než v ADS pufu.

Tato studie systematicky popsala osud DEX a jeho metabolitu ADR-925 v srdečních buňkách a u králíka *in vivo*. Dále doplnila klíčové informace nutné pro pochopení metabolismu DEX a ADR-925 a celkového významu obou látek pro vlastní kardioprotekci. Tato data budou následně využita pro korelaci farmakokinetiky a farmakodynamiky dexrazoxanu. Provedené experimenty poukazují na fakt, že množství ADR-925 v místě účinku (myokardu) je ovlivněno především distribucí z krevního oběhu. Získaná data hovoří proti dříve uznávanému mechanismu účinku DEX prostřednictvím chelatačně aktivního metabolitu (redukce ROS) a podporují novější teorii, která považuje za klíčovou depleci TOP2. Studie také ukazuje, že králík je vhodný experimentální model pro studium kardioprotekce DEX, neboť vykazuje velkou podobnost s daty z klinických studií.

Ve snaze o pochopení vztahu struktura-aktivita ve skupině bisdioxopiperazinů byla také syntetizována celá řada analogů DEX i ADR-925. Většina modifikací však vedla k úplné ztrátě kardioprotektivního účinku. Jako jeden z mála nadějných analogů se jevil 4,4'-(1-oxoethan-1,2-diyl)bis(piperazin-2,6-dion) (JR-311). V návaznosti na posun ve studiu mechanismu kardioprotekce v této skupině léčiv směrem k depleci TOP2, byl JR-311 vybrán pro další studium, protože v pilotním *in vitro* screeningu vykazoval interakci s TOP2 (**Práce č. 6**). Oproti DEX se JR-311 liší náhradou methylu ve spojovacím řetězci za oxo-skupinu. Vzhledem ke strukturní podobnosti s DEX bylo možné předpokládat, že bude i v případě této molekuly docházet k hydrolytickému štěpení piperazinových kruhů za vzniku polootevřeného (JR-H1) a plně otevřeného analogu (JR-H2).

Za použití standardního experimentálního protokolu bylo však zjištěno, že JR-311 má v porovnání s DEX nulový antiproliferativní účinek na HL-60 buňky a pouze malý synergický efekt při použití společně s DAU. Dále bylo prokázáno, že v testovaných koncentracích je JR-311 netoxický pro kardiomyocyty, ale na rozdíl od DEX je není schopen chránit před toxickým působením DAU, což byl v porovnání s pilotním experimentem překvapivý výsledek.

Proto byla pozornost dále zaměřena na odhalení příčiny nulového účinku JR-311 a rozporu s pilotním screeningem. Základním cílem této studie bylo získat detailní informace o osudu JR-311 v buněčném médiu a srdečních buňkách za podmínek *in vitro* experimentů. Za tímto účelem byla vyvinuta nová LC-MS/MS metoda pro současné stanovení JR-311, JR-H1 a JR-H2 v ADS pufru, buněčném médiu a NVCM buňkách. Jako základu bylo při vývoji využito metody pro analýzu DEX, která však byla za účelem zrychlení analýzy upravena pro UHPLC. Během analýz byl použit chromatografický systém Nexera UHPLC spojený s trojitým kvadrupólem (Shimadzu LCMS-8030). Separace analytů byla testována na

řadě kolon (Ascentis C18, Zorbax Bonus-RP), ale nejlepších výsledků bylo dosaženo na koloně Synergi Polar-RP (150x3 mm, 4 μ m). To bylo s ohledem na strukturní podobnost JR-311 a DEX do jisté míry očekávatelné. Stejně jako v případě analýzy DEX bylo nutné promýt před analýzou chromatografický systém 2 mM roztokem EDTA, abychom zajistili reprodukovatelné výsledky chelatačně aktivního metabolitu JR-H2 (analogie s ADR-925). EDTA byla následně vymyta mobilní fází, která se skládala z 2 mM mravenčanu amonného (A) a methanolu (B). Při analýze byl použit gradientový mód. I když byly všechny analyty eluovány do 10 minut, byla relativně dlouhá doba (8 minut) nezbytná pro ekvilibraci kolony po skončení gradientu. Zkrácení této doby vedlo k nereprodukovatelným měřením metabolitu JR-H2. Selektivita metody byla zajištěna použitím SRM módu při detekci všech analytů i vnitřního standardu. Metoda byla validována dle směrnice FDA s ohledem na selektivitu, přesnost, správnost, stabilitu analytů a vliv matrice. Linearita pro kvantifikaci všech hodnocených látek byla ověřena v rozmezí 2-200 μ M v ADS pufru a buněčném médiu a v rozmezí 1,5-50 pmol/10⁶ NVCM buněk.

Validovaná metoda byla následně použita při studiu stability JR-311 v buněčném médiu a ADS pufru a při hodnocení průniku JR-311 do NVCM buněk. Bylo zjištěno, že JR-311 podléhá v buněčném médiu rychlému rozkladu, který byl doprovázen rychlým vznikem meziproduktu JR-H1 a postupným nárůstem koncentrace chelatačně aktivního JR-H2. Stejný, ačkoliv pomalejší proces byl pozorován v ADS pufru. Přítomnost NVCM buněk v médiu neměla významný vliv na rychlost rozkladu. Na rozdíl od DEX bylo možné stanovit JR-311 uvnitř buněk pouze na počátku experimentu. Naopak metabolity JR-H1 i JR-H2 bylo možné kvantifikovat v intracelulárním prostoru po celou dobu experimentu. Chelatačně aktivní metabolit JR-H2 byl uvnitř buněk po 24 hodinové inkubaci pozorován dokonce ve větším množství než ADR-925 v analogickém pokusu s DEX. Analýza vzorků z *in vitro* experimentů odhalila, že hlavní limitací látky JR-311 je její rychlý rozklad, který je zřejmě zodpovědný za absenci biologických účinků látky *in vitro*. Na základě tohoto zjištění bylo modifikováno provedení *in vitro* experimentů, kdy byl během inkubace do média kontinuálně přidáván JR-311, aby byl kompenzován jeho rozklad. V tomto uspořádání JR-311 prokázal jak schopnost deplece TOP2B, tak významnou protekci vůči toxickému vlivu DAU.

S ohledem na vystavení buněk vysokým koncentracím rozkladných produktů při *in vitro* experimentech byla dále zaměřena pozornost na studium chelatace. JR-311 a JR-H1 nebyly chelatačně účinné. Na druhou stranu JR-H2, který byl ve vysoké koncentraci přítomný uvnitř NVCM buněk po inkubaci s JR-311, byl schopen chelatace železa uvnitř buněk a byl taktéž schopen odnímat ionty železa z komplexů s anthracykliny. V případě, že by byla tato

vlastnost pro kardioprotekci klíčová, dalo by se předpokládat, že díky vysokým koncentracím JR-H2 v buňkách by byl i ve standardním *in vitro* experimentu pozorován kardioprotektivní účinek JR-311. Tato zjištění opět poukázala na fakt, že klíčovým faktorem v kardioprotekci DEX by mohla být deplece TOP2, a ne dříve uváděná chelatace železa metabolitem ADR-925. Naše data jsou tedy v souladu s nejnovější teorií mechanismu kardioprotekce DEX, tj. prostřednictvím deplece TOP2B.

Předložená studie umožnila s využitím multidisciplinárního přístupu prokázat příčinu úvodního neúspěchu JR-311 v kardioprotekci a přinesla další argumenty pro definitivní objasnění mechanismu účinku bisdioxopiperazinů. Taktéž bylo prokázáno, že záměna methylu za oxo- skupinu ve spojovacím řetězci dexrazoxanu nevede ke ztrátě jeho účinku, ale pouze ke snížení stability struktury. Toto zjištění je důležité pro další vývoj bisdioxopiperazinových analogů.

4.3 Publikační činnost

4.3.1 Publikace zahrnuté v disertační práci

Práce číslo 1

Potůčková E., Hrušková K., Bureš J., Kovaříková P., Špirková I.A., Pravidíková K., Kolbabová L., Hergeselová T., Hašková P., Jansová H., Macháček M., Jirkovská A., Richardson V., Lane D.J., Kalinowski D.S., Richardson D.R., Vávrová K., Šimůnek T., **Structure-activity relationships of novel salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) analogs: iron chelation, anti-oxidant and cytotoxic properties**, PLoS One 2014; 9(11) (IF₂₀₁₄: 3.234)

Podíl předkladatele na publikaci

- Vývoj LC-UV metod pro analýzu nově připravených analogů SIH
- Validace vyvinutých LC-UV metod
- Hodnocení stability testovaných aroylhydrazonů v plasmě *in vitro*
- Podíl na textu publikace (HPLC metodika a stabilitní studie)

Práce číslo 2

Bureš J., Jansová H., Stariat J., Filipický T., Mladěnka P., Šimůnek T., Kučera R., Klimeš J., Wang Q., Franz K.J., Kovaříková P., **LC-UV/MS methods for the analysis of prochelator-Boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (BSIH) and its active chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH)**, J. Pharm. Biomed. Anal. 2014; 105: 55-63 (IF₂₀₁₄: 2.979)

Podíl předkladatele na publikaci

- Vývoj a validace LC-UV metody pro hodnocení SIH a BSIH v ADS a DMEM
- Analýza vzorků z *in vitro* aktivačního experimentu a vyhodnocení výsledků
- Vývoj a validace LC-MS metody pro hodnocení plasmě
- Hodnocení stability látek v plasmě *in vitro*
- Analýza vzorků z *in vivo* studie a vyhodnocení farmakokinetických parametrů
- Hlavní podíl na textu publikace

Práce číslo 3

Jansová H., Bureš J., Macháček M., Hašková P., Jirkovská A., Roh J., Wang Q., Franz K.J., Kovaříková P., Šimůnek T., **Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products**, Toxicology 2016; 305: 15-24 (IF₂₀₁₆: 3.582)

Podíl předkladatele na publikaci

- Vývoj LC-UV metody pro studium rozkladu hodnocených látek
- Validace LC-UV metody
- Analýza a vyhodnocení vzorků *in vitro* studia rozkladu látek
- Podíl na textu publikace (zejména části zabývající se HPLC stanovením)

Práce číslo 4

Hašková P., Jansová H., Bureš J., Macháček M., Jirkovská A., Franz K.J., Kovaříková P., Šimůnek T., **Cardioprotective effects of iron chelator HAPI and ROS-activated boronate prochelator BHAPI against catecholamine-induced oxidative cellular injury**, Toxicology 2016; 371: 17-28 (IF₂₀₁₆: 3.582)

Podíl předkladatele na publikaci

- Vývoj LC-UV metody pro analýzu HAPI a BHAPI
- Validace vyvinuté LC-UV metody
- Analýza vzorků *in vitro* studia aktivace/stability látek a vyhodnocení výsledků
- Podíl na textu publikace (zejména části zabývající se HPLC stanovením)

Práce číslo 5

Jirkovský E., Jirkovská A., Bureš J., Chládek J., Lenčová O., Stariat J., Pokorná Z., Karabanovich G., Roh J., Brázdová P., Šimůnek T., Kovaříková P., Štěrbá M., **Pharmacokinetics of the cardioprotective drug dexrazoxane and its active metabolite ADR-925 with focus on cardiomyocytes and the heart**, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2017; 364(3): 433-446 (IF₂₀₁₆: 3.867)

Podíl předkladatele na publikaci

- Validace LC-MS/MS metody pro stanovení DEX a ADR-925 v použitých matricích
- Analýza vzorků z *in vitro* inkubací ADR-925
- Analýza vzorků z farmakokinetické studie s DEX i ADR-925
- Inkubace DEX v plasmě, ADS a buněčných homogenátech *in vitro*, analýza vzorků
- Podíl na textu publikace (zejména LC-MS/MS metodika)

Práce číslo 6

Bureš J., Jirkovská A., Šesták V., Jansová H., Karabanovich G., Roh J., Štěrbá M., Šimůnek T., Kovaříková P., **Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite**, Toxicology 2017; 392: 1-10 (IF₂₀₁₆: 3.582)

Podíl předkladatele na publikaci

- Vývoj použité LC-MS/MS metody pro stanovení JR-311, JR-H1 a JR-H2
- Validace vyvinuté LC-MS/MS metody v použitých matricích
- Analýza vzorků *in vitro* studia stability a penetrace látek do buněk, vyhodnocení výsledků
- Významný podíl na textu publikace

4.3.2 Publikace nezahrnuté v disertační práci

Práce číslo 7

Cermanova J., Kadova Z., Dolezelova E., Zagorova M., Safka V., Hroch M., Laho T., Holeckova M., Mokry J., Kovarikova P., Bures J., Sterba M., Micuda S., **Deferoxamine but not dexrazoxane alleviates liver injury induced by endotoxemia in rats**, Shock 2014; 42(4): 372-379 (IF₂₀₁₄: 3.045)

Práce číslo 8

Sestak V., Stariat J., Cermanova J., Potuckova E., Chladek J., Roh J., Bures J., Jansova H., Prusa P., Sterba M., Micuda S., Simunek T., Kalinowski D.S., Richardson D.R., Kovarikova P., **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 2015; 6(40): 42411-42428 (IF₂₀₁₅: 5.008)

Práce číslo 9

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., Štěrbá M., **Are cardioprotective effects of NO-releasing drug molsidomine translatable to chronic anthracycline cardiotoxicity settings?**, Toxicology 2016; 372: 52-63 (IF₂₀₁₆: 3.582)

5. ZÁVĚR

Teoretická část této disertační práce se zabývá základními principy chromatografické separace a HPLC instrumentací, včetně vybraných trendů v dané oblasti. Dále jsou zde rozebrány vlastnosti biologických vzorků, způsoby jejich zpracování a pozornost je věnována také validaci bioanalytických metod. Poslední část teoretické sekce disertační práce pojednává o důležitosti železa pro organismus, významu jeho chelatace a o vlastnostech vybraných léčiv a potenciálních léčiv ze skupiny chelátorů železa, které byly v rámci práce analyzovány.

První tematický blok experimentální části práce shrnuje výsledky studia stability a vybraných biologických vlastností aroylhydrazonových chelátorů železa. V první řadě jsme prostudovali několik strukturních modifikací a jejich vliv na biologické vlastnosti a stabilitu aroylhydrazonů. Pro hodnocení stability nových analogů v plasmě byly vyvinuty nové LC-UV metody. Ověřili jsme, že přítomnost hydrazonové vazby v molekule je nezbytná pro chelatační aktivitu těchto látek. Jako nejvhodnější modifikace z pohledu stability a protinádorového působení se ukázala substituce vodíku v blízkosti hydrazonové vazby alkylem (analog H17), případně iso-alkylem rozvětveným dále od hydrazonové vazby (analog H18). Práce vedla k lepšímu poznání vztahu struktura-aktivita ve skupině aroylhydrazonových chelátorů a k výběru dvou potenciálních kandidátů pro další studium.

Kromě studia vztahu struktura-aktivita jsme se zabývali možností zacílit účinek aroylhydrazonů do místa potřeby a snížit tak jejich toxicitu při dlouhodobém podání. V tomto ohledu se ukázal být výhodný princip prochelátoru, který by byl aktivován až v místě oxidačního stresu. Pro studium stability a aktivace vybraných prochelátorů (BSIH a BHAPI) jsme vyvinuli LC-UV a LC-MS metody. S jejich využitím jsme potvrdili, že prochelátor BSIH je stabilnější v buněčném médiu i plasmě a má v porovnání s předlohou látkou lepší farmakokinetické vlastnosti (především biologický poločas). Zároveň jsme ověřili, že je peroxidem vodíku rychle aktivován na účinnou látku, které však vzniklo pouze 25 % očekávaného množství.

V následující práci jsme prostudovali rozklad BSIH a prokázali, že při jeho aktivaci vzniká kromě SIH také velké množství salicylaldehydu. To se ukázalo jako relativně výhodné, protože salicylaldehyd vykazuje cca 50 % chelatační účinnosti SIH a pravděpodobně tak přispívá k celkovému cytoprotektivnímu účinku SIH. Zároveň jsme prokázali, že je BSIH relativně netoxický, před aktivací není schopen chelatace, a nemůže tedy narušit homeostázu železa v organismu. Vzhledem k popsáním vlastnostem se BSIH jeví jako dobrý kandidát pro další studium.

Konceptu prochelátoru využívá také BHAPI, který je proléčivem aroylhydrazonového chelátoru HAPI se zvýšenou stabilitou v plasmě (v porovnání se SIH). V poslední části tohoto bloku jsme studovali možnou ochranu buněk proti toxickému působení katecholaminů s využitím aroylhydrazonů HAPI a BHAPI. Při hodnocení stability a aktivace jsme využili vyvinutou LC-UV metodu. Během studie jsme potvrdili, že BHAPI není před vystavením oxidačnímu stresu chelatačně aktivní a že při jeho aktivaci vzniká ekvimolární množství HAPI. Prokázali jsme vliv železa na oxidaci a toxicitu katecholaminů a také schopnost obou studovaných látek bránit tomuto jevu. Vzhledem k výhodným biologickým vlastnostem se taktéž HAPI a BHAPI hodí k dalšímu studiu.

Druhý blok experimentální části disertační práce je nejprve zaměřen na analýzu kardioprotektiva dexrazoxanu. Cílem práce bylo systematické studium metabolismu DEX *in vitro* i *in vivo* s důrazem na místo očekávaného účinku – myokard. Uplatnění našla vyvinutá LC-MS, s jejímž využitím byly analyzovány vzorky z komplexní *in vitro* i *in vivo* studie. Práce popisuje chování DEX a jeho metabolitu ADR-925 v buněčném médiu v přítomnosti a absenci NVCM buněk a také potvrzuje schopnost hydrofilního metabolitu ADR-925 prostupovat buněčnou membránou působením aktivního transportu. Během práce jsme dále studovali farmakokinetiku DEX a ADR-925 u králíka. Stanovili jsme koncentrační profily v plasmě i tkáních (myokard, játra, kosterní sval). Práce poukazuje na fakt, že ADR-925 se do buněk dostává spíše distribucí z krevního řečiště než aktivací DEX na místě a podporuje nejnovější teorii o mechanismu kardioprotektivního účinku DEX prostřednictvím deplece TOP2.

V další části práce jsme se věnovali vztahu struktura-aktivita ve skupině bisdioxopiperazinů. Konkrétně jsme studovali nový analog DEX – JR-311, který vznikl náhradou methylu ve spojovacím řetězci molekuly za oxo- skupinu. JR-311 má podobné vlastnosti jako DEX a je transformován na chelatačně aktivní metabolit JR-H2. Pro studium stability a průniku JR-311 do buněk jsme vyvinuli novou LC-MS metodu. Důkladným studiem *in vitro* jsme zjistili, že JR-311 vykazuje stejně jako předlohová molekula kardioprotektivní účinky vůči toxickému působení DAU a způsobuje depleci TOP2B. Jeho hlavním problémem je však nízká stabilita, která limituje jeho další využití. Práce rozšiřuje znalosti o vztahu struktura-aktivita (stabilita) bisdioxopiperazinů, zpochybňuje dřívější teorii o mechanismu kardioprotekce DEX (chelatace metabolitu ADR-925) a vyzdvihuje klíčovou roli TOP2B v kardioprotekci. V neposlední řadě studie poukazuje na důležitost multidisciplinárního přístupu při hodnocení nových potenciálních léčiv.

6. PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONFERENCÍCH

6.1 Přednášky

Bures J., Filipsky T., Mladenka P., Klimes J., Kovarikova P., *LC-MS/MS method for analysis of aroylhydrazone pro-chelator and its active form in plasma; Application to a pilot pharmacokinetic study*, 3. 2. 2015, FaF UK v Hradci Králové

Bures J., Haskova P., Simunek T., Klimes J., Kovarikova P., *Development of analytical methods and in vitro evaluation of aroylhydrazone pro-chelators*, 28. 1. 2014, FaF UK v Hradci Králové

Bures J., Kresova J., Kovarikova P., *The simultaneous analysis of a pro-drug – boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone and its active form – salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in biological materials*, 30. 1. 2013, FaF UK v Hradci Králové

6.2 Postery

Bures J., Sestak V., Jirkovsky E., Karabanovich G., Roh J., Sterba M., Kovarikova P., *LC-MS/MS method for analysis of novel potential cardioprotective drug D-MET and pilot pharmacokinetic study*, vědecká konference SAL 2016, 22. – 24. 6. 2016, Hradec Králové

Bures J., Jirkovska A., Sestak V., Karabanovich G., Simunek T., Roh J., Kovarikova P., *In vitro assessment of potential cardioprotective agent – JR-311 using LC-MS/MS*, vědecká konference Chiranal, 6. – 9. 6. 2016, Olomouc

Bures J., Jansova H., Sestak V., Roh J., Klimes J., Kovarikova P., *UHPLC-MS/MS method development for analysis of a new potential cardioprotective agent – JR-311*, HPLC 2015, 21. – 25. 6. 2015, Ženeva

Bures J., Sestak V., Jansova H., Kratochvil M., Roh J., Klimes J., Kovarikova P., *Simultaneous analysis of dexrazoxane and its putative active metabolite using HPLC-MS/MS*, CECE 2014, 20. – 22. 10. 2014, Brno

Bures J., Jansova H., Stariat J., Filipsky T., Mladenka P., Simunek T., Klimes J., Kovarikova P., *LC-UV/MS methods for the analysis of aroylhydrazone pro-chelator and its active substance: utilization in an in vitro bioactivation and a pilot pharmacokinetic study*, 5th International Conference and Exhibition on Analytical and Bioanalytical Techniques, 18. – 21. 8. 2014, Peking

Bures J., Haskova P., Simunek T., Klimes J., Kovarikova P., *HPLC methods for the analysis of aroylhydrazone pro-chelators and their utilization in in vitro bioactivation study*, vědecká konference Chiranal, 10. – 14. 2. 2014, Olomouc

Bures J., Vavrova A., Jirkovsky E., Lencova O., Simunek T., Sterba M., Klimes J., Kovarikova P., *LC-MS analysis of a putative active form of dexrazoxane – ADR-925 in biological samples*, vědecká konference SAL 2013, 2. – 5. 9. 2013, Velké Karlovice

Bures J., Jansova H., Kovarikova P., *HPLC method for analysis of prochelator – boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone and its application to in vitro activation study*, vědecká konference HPLC2013, 16. – 20. 6. 2013, Amsterdam

7. ÚČAST V GRANTOVÝCH PROJEKTECH

7.1 Hlavní řešitel

Grant **GAUK 1324214** – Bioanalytická studie metabolismu a bioaktivace nových kardioprotektivních látek

7.2 Člen řešitelského týmu

Grant **GAČR 13-15008S** – Nová potenciální kardioprotektiva: studium vztahů mezi chemickou strukturou a protektivním účinkem u různých typů poškození myokardu

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

Grant **GAUK 903113** – Nová protinádorová léčiva odvozená od thiosemikarbazonu – LC-MS studie metabolismu a farmakokinetiky

Grant **GAUK 367911** – Studium kardioprotektivních účinků nových aroylhydrazonových prochelátorů železa aktivovaných oxidačním stresem

8. ABSOLVOVANÉ STÁŽE

2015 – šestitýdenní odborná stáž ve společnosti **Teva Czech Industries, s.r.o.** (oddělení **QC TAPI**), Opava, Česká republika

Náplň stáže: 1) Vývoj a validace metody NIR pro hodnocení čistoty rozpouštědel v průmyslové výrobě, 2) Zpracování a analýza vzorků DH-ergotoxin mesylátu z procesní validace (stanovení obsahu zbytkových rozpouštědel s využitím GC), 3) Spolupráce při překladu operačních postupů z ČJ do AJ

2014 – měsíční zahraniční stáž na katedře farmaceutické chemie, **University of Eastern Finland**, Kuopio, Finsko, **prof. Seppo Auriola**

Účast na projektu: *Identification of possible alcohol biomarkers from placenta using high res UPLC-QTOF and MS/MS*

Náplň stáže: 1) Účast při přípravě biologických vzorků (placenta), 2) Zpracování dat z UPLC-QTOF analýz (RP a HILIC, pozitivní i negativní mód), 3) Spolupráce při statistické analýze dat (PCA)

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Karlíček, R. et al. *Analytická chemie pro farmaceuty*. Karolinum, Praha 2009. ISBN 978-80-246-1453-3
2. Klouda, P. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, Ostrava 2003. ISBN 80-86369-07-2
3. Klimeš, J. et al *Kontrola léčiv I*. Karolinum, Praha 2008. ISBN 978-80-246-0419-0
4. Ahuja, S.; Scypinski, S. *Handbook of modern pharmaceutical analysis*. Academic Press, San Diego 2001. ISBN 978-9351070597
5. Ramanathan, R. *Mass spectrometry in drug metabolism and pharmacokinetics*. Wiley, Hoboken 2009. ISBN 9780471751588
6. Dong, M. W., *Modern HPLC for practicing scientists*. Wiley, Hoboken 2006. ISBN 978-0-471-72789-7
7. Kazakevich, Y.; LoBrutto, R. *HPLC for pharmaceutical scientists*. Wiley, Hoboken 2007. ISBN 978-0-471-68162-5
8. Churáček, J. et al. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Academia, Praha 1993. ISBN 8020000100
9. Snyder, L. R. et al. *Practical HPLC method development*. Wiley, New York 1997. ISBN 978-0-471-00703-6
10. Braithwaite, A.; Smith, F. J. *Chromatographic methods*. Springer, London 1996. ISBN 978-0751401585
11. Hayes, R. et al. Core-shell particles: preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1357*, 36-52.
12. Turková, J. *Bioaffinity chromatography*. Elsevier, Amsterdam 1993. ISBN 9780444890306
13. Hage, D. S. Affinity chromatography: A review of clinical applications. *Clin. Chem.*, **1999**, *45(5)*, 593-615.
14. Rozing, G. et al. A system and columns for capillary HPLC. *Am. Lab.*, **2001**, *33(10)*, 26-35.
15. Brice, R. W. et al. Fused-core, sub-2 μ m packings, and monolithic HPLC columns: a comparative evaluation. *J. Sep. Sci.*, **2009**, *32(15-16)*, 2723-2731.
16. Bunch, D. R.; Wang, S. H., Applications of monolithic columns in liquid chromatography-based clinical chemistry assays. *J. Sep. Sci.*, **2011**, *34(16-17)*, 2003-2012.

17. Peters, E. C. et al. Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. *Anal. Chem.*, **1997**, *69*(17), 3646-3649.
18. McCalley, D. V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1171*(1-2), 46-55.
19. Hemstrom, P.; Irgum, K. Hydrophilic interaction chromatography. *J. Sep. Sci.*, **2006**, *29*(12), 1784-1821.
20. Jandera, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, *692*(1-2), 1-25.
21. Kovaříková, P. et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of a moderately lipophilic drug from its highly polar metabolites--the cardioprotectant dexrazoxane as a model case. *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*(3), 416-426.
22. Zhang, L. et al. Mixed-mode chromatographic stationary phases: Recent advancements and its applications for high-performance liquid chromatography. *TrAc Trends Anal. Chem.*, **2016**, *82*, 143-163.
23. Yang, Y.; Geng, X. Mixed-mode chromatography and its applications to biopolymers. *J. Chromatogr. A*, **2011**, *1218*(49), 8813-8825.
24. Zhao, G. et al. Ligands for mixed-mode protein chromatography: Principles, characteristics and design. *J. Biotechnol.*, **2009**, *144*(1), 3-11.
25. Sestak, V. et al. 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*, **2015**, *6*(40), 42411-42428.
26. Pesek, J. et al. Improvement of peak shape in aqueous normal phase analysis of anionic metabolites. *J. Sep. Sci.*, **2011**, *34*(24), 3509-3516.
27. Bawazeer, S. et al. A comparison of the chromatographic properties of silica gel and silicon hydride modified silica gels. *J. Chromatogr. A*, **2012**, *1263*, 61-67.
28. Hoffmann, E.; Stroobant, V. *Mass spectrometry: principles and applications*. Wiley, Hoboken 2007. ISBN 978-0-470-03310-4
29. Gross, J. H. *Mass spectrometry: a textbook*. Springer, Berlin 2004. ISBN 978-3-642-10711-5
30. McMaster, M. C. *LC/MS: a practical user's guide*. Wiley, Hoboken 2005. ISBN 978-0-471-73657-8
31. Boyd, R. et al. *Trace quantitative chemical analysis by mass spectrometry*. Wiley, Hoboken 2008. ISBN 978-0-470-05771-1
32. Xie, C. et al. Recent advances in metabolite identification and quantitative bioanalysis by LC-Q-TOF MS. *Bioanalysis*, **2012**, *4*(8), 937-959.

33. Bonfiglio, R. et al. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, *13(12)*, 1175-1185.
34. Zotou, A. An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Cent. Eur. J. Chem.*, **2012**, *10(3)*, 554-569.
35. Szumski, M.; Buszewski, B. State of the art in miniaturized separation techniques. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2002**, *32(1)*, 1-46.
36. Nováková, L. et al. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*, **2006**, *68(3)*, 908-918.
37. Walter, T.; Andrews, R. Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation. *TrAc Trends Anal. Chem.*, **2014**, *63*, 14-20.
38. Fekete, S. et al. Current and future trends in UHPLC. *TrAc Trends Anal. Chem.*, **2014**, *63*, 2-13.
39. Fekete, S. et al. Comparison of the most recent chromatographic approaches applied for fast and high resolution separations: Theory and practice. *J. Chromatogr. A*, **2015**, *1408*, 1-14.
40. Ares, A.; Bernal, J. Hydrophilic interaction chromatography in drug analysis. *Cent. Eur. J. Chem.*, **2012**, *10(3)*, 534-553.
41. Buszewski, B.; Noga, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, *402(1)*, 231-247.
42. Gama, M. et al. Hydrophilic interaction chromatography. *TrAc Trends Anal. Chem.*, **2012**, *37*, 48-60.
43. Ohla, S.; Belder, D. Chip-based separation devices coupled to mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2012**, *16(3-4)*, 453-459.
44. Stoll, D. R. et al. Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1168(1-2)*, 3-43.
45. Klimeš, J. et al. *Kontrola léčiv II*. Karolinum, Praha 2007. ISBN 9788024614601
46. Ministerstvo zdravotnictví ČR *Český lékopis 2009*. Grada, Praha 2009. ISBN 978-80-247-2994-7
47. Stokvis, E. et al. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2005**, *19(3)*, 401-407.
48. Wang, S. et al. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, *43(2)*, 701-707.

49. Xu, Q. A.; Madden, T. L. *LC-MS in drug bioanalysis*. Springer, New York 2012. ISBN 978-1-4614-3828-1
50. Kataoka, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *TrAc Trends Anal. Chem.*, **2003**, 22(4), 232-244.
51. Chen, Y. et al. Sample preparation. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1184(1-2), 191-219.
52. Kole, P. L. et al. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.*, **2011**, 25(1-2), 199-217.
53. Evans, G. *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*. CRC Press, Boca Raton 2004. ISBN 9780415275194
54. Babjuk, J. et al. *Bioanalytika léků*. Avicenum, Praha 1990. ISBN 9788020100832
55. Pawliszyn, J.; Lord, H. L. *Handbook of sample preparation*. Wiley, Hoboken 2010. ISBN 9780470099346
56. Pawliszyn, J. *Sampling and sample preparation for field and laboratory: fundamentals and new directions in sample preparation*. Elsevier, Amsterdam 2002. ISBN 978-0444505101
57. Thurman, E. M.; Mills, M. S. *Solid-phase extraction: principles and practice*. Wiley, New York 1998. ISBN 9780471614227
58. Chen, L. et al. On-line Coupling of Solid-Phase Extraction to Liquid Chromatography-A Review. *J. Chromatogr. Sci.*, **2009**, 47(8), 614-623.
59. Bylda, C. et al. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *Analyst*, **2014**, 139(10), 2265-2276.
60. Ahmad, S. et al. HybridSPE: A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC-ESI-MS Bioanalysis. *J. Pharm. Bioallied. Sci.*, **2012**, 4(4), 267-275.
61. Abdel-Rehim, M., Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217(16), 2569-2580.
62. FDA – CDER and CVM, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf> [staženo 4. 7. 2016].
63. EMEA – CHMP, *Guideline on Validation of Bioanalytical Methods*. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/12/WC500018062.pdf [staženo 21. 6. 2017].
64. Wahlich, J.; Carr, G. Chromatographic system suitability tests - What should we be using. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1990**, 8(8-12), 619-623.
65. Causon, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **1997**, 689(1), 175-180.

66. Trojan, S. et al. *Lékařská fyziologie*. Grada, Praha 2003. ISBN 9788024705125
67. Mourek, J. *Fyziologie: Učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. Grada, Praha 2005. ISBN 978-80-247-3918-2
68. Andrews, N. C. Disorders of iron metabolism. *N. Engl. J. Med.*, **1999**, *341(26)*, 1986-1995.
69. Johnson, E. E.; Wessling-Resnick, M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes Infect.*, **2012**, *14(3)*, 207-216.
70. Kalinowski, D. S.; Richardson, D. R. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol. Rev.*, **2005**, *57(4)*, 547-583.
71. Silbernagl, S.; Despopoulos, A. *Atlas fyziologie člověka*. Grada, Praha 2004. ISBN 978-80-247-4271-7
72. Haskova, P. et al. Iron chelation with salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone protects against catecholamine autoxidation and cardiotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, *50(4)*, 537-549.
73. Hruskova, K. et al. Synthesis and initial in vitro evaluations of novel antioxidant aroylhydrazone iron chelators with increased stability against plasma hydrolysis. *Chem. Res. Toxicol.*, **2011**, *24(3)*, 290-302.
74. Prousek, J. Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure Appl. Chem.*, **2007**, *79(12)*, 2325-2338.
75. Chen, S. X.; Schopfer, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, **1999**, *260(3)*, 726-735.
76. Charkoudian, L. K. et al. A pro-chelator triggered by hydrogen peroxide inhibits iron-promoted hydroxyl radical formation. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128(38)*, 12424-12425.
77. Crisponi, G. et al. Oral iron chelators for clinical use. *Polyhedron*, **1999**, *18(25)*, 3219-3226.
78. Crisponi, G.; Remelli, M. Iron chelating agents for the treatment of iron overload. *Coord. Chem. Rev.*, **2008**, *252(10-11)*, 1225-1240.
79. Charkoudian, L. K. et al. Iron prochelator BSIH protects retinal pigment epithelial cells against cell death induced by hydrogen peroxide. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, *102(12)*, 2130-2135.
80. Bendova, P. et al. Comparison of clinically used and experimental iron chelators for protection against oxidative stress-induced cellular injury. *Chem. Res. Toxicol.*, **2010**, *23(6)*, 1105-1114.
81. Tam, T. F. et al. Iron chelator research: past, present, and future. *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *10(12)*, 983-995.

82. Yang, L. et al. Deferasirox - A review of its use in the management of transfusional chronic iron overload. *Drugs*, **2007**, *67*(15), 2211-2230.
83. Salehi, S. et al. Synthesis, characterization and in vitro anticancer evaluations of two novel derivatives of deferasirox iron chelator. *Eur. J. Pharmacol.*, **2016**, *781*, 209-217.
84. Hruskova, K. et al. Aroylhydrazone iron chelators: Tuning antioxidant and antiproliferative properties by hydrazide modifications. *Eur. J. Med. Chem.*, **2016**, *120*, 97-110.
85. Kovarikova, P. et al. Investigation of the stability of aromatic hydrazones in plasma and related biological material. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, *47*(2), 360-370.
86. Fillebeen, C.; Pantopoulos, K. Iron inhibits replication of infectious hepatitis C virus in permissive Huh7.5.1 cells. *J. Hepatol.*, **2010**, *53*(6), 995-999.
87. Kovarikova, P. et al. Chromatographic methods for the separation of bicompatible iron chelators from their synthetic precursors and iron chelates. *J. Sep. Sci.*, **2004**, *27*(17-18), 1503-1510.
88. Hermes-Lima, M. et al. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1523*(2-3), 154-160.
89. Richardson, D. et al. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues. Study of their stability in acidic, neutral and basic aqueous solutions by ultraviolet-visible spectrophotometry. *Biol. Met.*, **1989**, *2*(2), 69-76.
90. Richardson, D. R. et al. Iron Chelators of the Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone Class .1. Ionization Characteristics of the Ligands and Their Relevance to Biological Properties. *Inorganica Chim. Acta*, **1990**, *170*(2), 165-170.
91. Kovarikova, P. et al. Development of high-performance liquid chromatographic determination of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in rabbit plasma and application of this method to an in vivo study. *J. Sep. Sci.*, **2005**, *28*(12), 1300-1306.
92. Jansová, H. et al. Comparison of various iron chelators and prochelators as protective agents against cardiomyocyte oxidative injury. *Free Radic. Biol. Med.*, **2014**, *74*, 210-221.
93. Sterba, M. et al. Iron chelation-afforded cardioprotection against chronic anthracycline cardiotoxicity: a study of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH). *Toxicology*, **2007**, *235*(3), 150-166.
94. Berndt, C. et al. Chelation of lysosomal iron protects against ionizing radiation. *Biochem. J.*, **2010**, *432*, 295-301.
95. Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic stability of hydrazones and oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*(39), 7523-7526.
96. Kielar, F. et al. Prochelator BHAPI protects cells against paraquat-induced damage by ROS-triggered iron chelation. *Metallomics*, **2012**, *4*(9), 899-909.

97. Kovarikova, P. et al. HPLC study on stability of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, *40(1)*, 105-112.
98. Kovarikova, P. et al. HPLC determination of a novel aroylhydrazone iron chelator (o-108) in rabbit plasma and its application to a pilot pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2006**, *838(2)*, 107-112.
99. Sterba, M. et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxid. Redox Signal.*, **2013**, *18(8)*, 899-929.
100. Anand, P. et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm. Res.*, **2008**, *25(9)*, 2097-2116.
101. Kleinsmith, L. J. *Principles of cancer biology*. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco 2006. ISBN 978-0805340037
102. Lundqvist, E. A. et al. Principles of chemotherapy. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, **2015**, *131*, 146-149.
103. Cvetkovic, R.S.; Scott, L. J. Dexrazoxane - A review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. *Drugs*, **2005**, *65(7)*, 1005-1024.
104. Hershko, C. et al. The Role of Iron and Iron Chelators in Anthracycline Cardiotoxicity. *Leuk. Lymphoma*, **1993**, *11(3-4)*, 207-214.
105. Schroeder, P. E.; Hasinoff, B. B. The doxorubicin-cardioprotective drug dexrazoxane undergoes metabolism in the rat to its metal ion-chelating form ADR-925. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2002**, *50(6)*, 509-513.
106. Hasinoff, B. et al. Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines. *Curr. Med. Chem.*, **1998**, *5(1)*, 1-28.
107. Hasinoff, B. B. et al. The metabolites of the cardioprotective drug dexrazoxane do not protect myocytes from doxorubicin-induced cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, **2003**, *64(3)*, 670-678.
108. Vavrova, A., et al., Catalytic inhibitors of topoisomerase II differently modulate the toxicity of anthracyclines in cardiac and cancer cells. *PLoS One*, **2013**, *8(10)*, e76676.
109. Martin, E. et al. Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Toxicology*, **2009**, *255(1-2)*, 72-79.
110. Hasinoff, B. B; Herman, E. H. Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug?. *Cardiovasc. Toxicol.*, **2007**, *7(2)*, 140-144.
111. Zhang, S. et al. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.*, **2012**, *18(11)*, 1639-1642.

112. Schroeder, P. E. et al. Metabolism of dexrazoxane (ICRF-187) used as a rescue agent in cancer patients treated with high-dose etoposide. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **2003**, *52*(2), 167-174.
113. Rhomberg, W.; Hellmann, K. *Razoxane and dexrazoxane - two multifunctional agents: experimental and clinical results*. Springer, Dordrecht 2010. ISBN 978-90-481-9168-0
114. Lyu, Y. et al. Topoisomerase II beta-Mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res.*, **2007**, *67*(18), 8839-8846.
115. Deng, S. et al. Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both Topoisomerase II isoforms. *BMC Cancer*, **2014**, *14*, 842.
116. Burke, T. G. et al. Characterization of the Aqueous Decomposition Products of (+)1,2-Bis(3,5-Dioxopiperazinyl-1-yl)-Propane (Icrf-187) by Liquid-Chromatographic and Mass-Spectral Analysis. *J. Pharm. Sci.*, **1991**, *80*(4), 338-340.
117. Kovarikova, P. et al. 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. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2013**, *76*, 243-251.
118. Hasinoff, B. B. Quantitation of the dexrazoxane hydrolysis product ADR-925 by fluorescence detection of its terbium(III) complex after high-performance liquid chromatographic separation. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **1994**, *656*(2), 451-455.
119. Jirkovska-Vavrova, A. et al. Synthesis and analysis of novel analogues of dexrazoxane and its open-ring hydrolysis product for protection against anthracycline cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Toxicol. Res.*, **2015**, *4*(4), 1098-1114.

10. PŘÍLOHY

10.1 Příloha číslo 1

Potůčková E., Hrušková K., Bureš J., Kovaříková P., Špírková I.A., Pravdíková K., Kolbabová L., Hergeselová T., Hašková P., Jansová H., Macháček M., Jirkovská A., Richardson V., Lane D.J., Kalinowski D.S., Richardson D.R., Vávrová K., Šimůnek T., **Structure-activity relationships of novel salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) analogs: iron chelation, anti-oxidant and cytotoxic properties**, PLoS One 2014; 9(11) (IF₂₀₁₄: 3.234)

10.2 Příloha číslo 2

Bureš J., Jansová H., Stariat J., Filipický T., Mladěnka P., Šimůnek T., Kučera R., Klimeš J., Wang Q., Franz K.J., Kovaříková P., **LC-UV/MS methods for the analysis of prochelator-Boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (BSIH) and its active chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH)**, J. Pharm. Biomed. Anal. 2014; 105: 55-63 (IF₂₀₁₄: 2.979)

10.3 Příloha číslo 3

Jansová H., Bureš J., Macháček M., Hašková P., Jirkovská A., Roh J., Wang Q., Franz K.J., Kovaříková P., Šimůnek T., **Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products**, Toxicology 2016; 305: 15-24 (IF₂₀₁₆: 3.582)

10.4 Příloha číslo 4

Hašková P., Jansová H., Bureš J., Macháček M., Jirkovská A., Franz K.J., Kovaříková P., Šimůnek T., **Cardioprotective effects of iron chelator HAPI and ROS-activated boronate prochelator BHAPI against catecholamine-induced oxidative cellular injury**, *Toxicology* 2016; 371: 17-28 (IF₂₀₁₆: 3.582)

10.5 Příloha číslo 5

Jirkovský E., Jirkovská A., Bureš J., Chládek J., Lenčová O., Stariat J., Pokorná Z., Karabanovich G., Roh J., Brázdová P., Šimůnek T., Kovaříková P., Štěrbá M., **Pharmacokinetics of the cardioprotective drug dexrazoxane and its active metabolite ADR-925 with focus on cardiomyocytes and the heart**, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2017; 364(3): 433-446 (IF₂₀₁₆: 3.867)

10.6 Příloha číslo 6

Bureš J., Jirkovská A., Šesták V., Jansová H., Karabanovich G., Roh J., Štěrbá M, Šimůnek T., Kovaříková P., **Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite**, Toxicology 2017; 392: 1-10 (IF₂₀₁₆: 3.582)