

Oponentský posudek

na disertační práci mgr. Jána Stariata

„Analytické hodnotenie liečiv a potenciálnych liečiv zo skupiny látok chelatujúcich železo.“

Předložená disertační práce má celkem 160 stran. Teoretická část čítá 43 stran a je doložena 86 citacemi. Experimentální část (10 stran) tvoří komentář k pěti původním vědeckým pracím, jejichž kopie jsou přiloženy (86 stran). Čtyři ze zmíněných prací byly publikovány v odborných zahraničních časopisech. Pátá je v recenzním řízení v Rapid Communications in Mass Spectrometry. Na všech čtyřech publikacích věnovaných analytickému hodnocení chelátorů železa odvozených od thiosemikarbazonu je zjevný rozhodující autorský podíl doktoranda jako prvního autora.

Teoretická část představuje hlavní analytickou techniku této disertační práce, tj vysokouúčinnou kapalinovou chromatografii, vývoj HPLC metod a jejich validaci. Následuje souhrn dostupných informací o studovaných látkách, jejich mechanismech účinku a známých metabolitech. Samostatná kapitola je věnována metabolismu léčiv. Chvályhodná je snaha autora diskutovat detailněji pouze ty aspekty, které přímo souvisejí s řešenou problematikou.

Hlavním cílem disertační práce byl vývoj analytických metod využitelných při studiu nových antiproliferativně účinných chelátorů železa odvozených od thiosemikarbazonu. Především, že s ohledem na absenci literárních údajů, se vesměs jedná o originální metody.

První práce publikovaná v J. Chromatogr. řeší stabilitu dvou modelových derivátů thiosemikarbazonu v krevní plazmě tří živočišných druhů. Pro obě studované látky byly vyvinuty a validovány RPLC-UV metody zajišťující separaci mateřské látky od očekávaných rozkladných produktů. 24 hod inkubace prokázala výrazně vyšší hydrolytickou stabilitu thiosemikarbazonů v plazmě oproti jejich aroylhydrazonovým předchůdcům. Jako málo významná se ukázala být i předpokládaná oxidace thiokarbonylové skupiny.

Druhá práce je věnována vývoji intravenosní lékové formy dalšího z potenciálních léčiv odvozených od thiosemikarbazonu, a to Bp4eT. Analytika této látky byla komplikována přítomností dvou konvertibilních geometrických izomerů v roztocích (syn-anti izomerů). Kombinace APCI-MS/MS umožnila nastavit srovnatelnou intenzitu ionizace obou izomerů, součet ploch píků obou izomerů tedy nezávisel na jejich poměrném zastoupení v roztoku. Vyvinutá LC-APCI-MS/MS byla po validaci využita k vývoji intravenosní lékové formy. Práce byla publikována v Anal Bioanal Chem a umožnila následné studium metabolismu Bp4eT (třetí práce publikovaná v Anal. Bioanal. Chem.)

K identifikaci in vitro a in vivo metabolitů 1 fáze u Bp4eT byla užita LC-MS/MS (iontová past). Potkaní i lidská mikrosomální frakce jater produkovala 2 shodné metabolity. Studium fragmentace svědčilo pro biotransformaci cestou oxidace thiokarbonylové skupiny, metabolitům byla přisouzena struktura semikarbazonu a amidrazonu. Oba navržené metabolity byly následně připraveny chemickou oxidací Bp4eT. Identita metabolitů a připravených standardů byla potvrzena LC-MS/MS analýzou, jejich struktura potom pomocí NMR a IČ spektrofotometrie. V plazmě, moči i stolici potkana byl, kromě dvou zmíněných metabolitů nalezen další metabolit, patrně produkt hydroxylace amidrazonu.

Čtvrtá práce, která je v recenzním řízení, se zabývala studiem 1. a 2. fáze metabolismu dalšího analogu thiosemikarbazonové série, který nese označení DpC. In vitro experimenty byly provedeny s mikrozomální a S9 frakcí lidských jater, k identifikaci metabolitů bylo možno využít LC-ESI-QTOF. Nalezeno bylo 10 metabolitů 1 fáze biotransformace a dva

glukuronidy. Jejich identifikace byla založena na přesném určení molekulové hmotnosti prekurzorových a produktových iontů a znalosti obecných principů metabolismu léčiv. Sporná zůstala identifikace jediného metabolitu, u něhož MS/MS fragmentace neumožnila rozlišit mezi přítomností hydroxyly a N-oxidu. Tato práce potvrzuje vysoký potenciál, který nabízí hybridní hmotnostní detektor QTOF pracující s vysokým rozlišením při současném přesném určení hmotnosti v oblasti identifikace metabolitů.

Detailnějším rozbořením odborných publikací si dovoluji demonstrovat úctyhodné kvantum experimentální práce, které bylo věnováno studiu potenciálních léčiv odvozených od thiosemikarbazonu. Uspořádání experimentů bylo důkladně promyšleno a nabízí minimum prostoru k výhradám. Důsledkem jsou nové poznatky, které budou bezpochyby iniciovat další výzkum v této perspektivní skupině látek.

Pátá práce, jíž je doktorand spoluautorem a kterou zde pouze zmiňuji, je věnována problematice současného stanovení kardioprotektiva dexrazoxanu a jeho metabolitů kapalinovou chromatografií v HILIC modu. Prezentována byla v J. Chromatogr.

K obsahu disertace nemám věcné námitky, zpracována byla pečlivě. Ojedinelé formální nedostatky, resp. nepřesné formulace, které jsem postřehl, uvádím v poznámkách.

Poznámky k disertaci:

Některé zkratky jsou v textu užity opakovaně, do souhrnu zkratk přesto nebyly zahrnuty (str. 41 ... a tým chelatócia železa priamo v LIP; str. 59 ... boli detokované v SRM módě.)

str. 22 „Tá môže mať podľa veľkosti náboja charakter tzv. slabého, popřípadě silného meniča iónov.“ Komentář: Síla ionexu není dána velikostí náboje ale silou přítomné funkční skupiny jako kyseliny, resp. baze. Silný katex je v prakticky použitelném rozsahu pH ionizovaný, slabý ionex potom ionizovatelný, jak je již správně zmíněno v dalším textu.

str. 35 „Výťažnosť – sa hodnotí porovnaním extrakcie matrice obsahujúcej analyt a matrice s prídavkom známeho množstva analytu až po extrakcii.“ Komentář: Popsaný postup užívá analytik spíše ke kontrole výtěžnosti analytů v jednotlivých krocích, z nichž sestává zpracování vzorků před vlastní analýzou. (Např. zpracování vzorků na kolonkách + odpaření eluátu k suchu + derivatizace.) Při validaci analytické metody se zjišťuje absolutní recovery, a to postupem, který jste výstižně popsal na str. 88 (Práce 1).

str. 52 „orgánom zodpovedným za metabolizmus liečiv pomocou CYP50 je pečeň.“ (překlep v označení CYP450).

Otázky:

1. Studované analyty jsou účinnými chelátory železa. Během HPLC separace může docházet k jejich komplexaci a následné redukci odezvy detektoru. (Práce 4). UV detekce dovoluje maskovat ionty železa přidávkem EDTA k eluentu (Práce 1). V kombinaci s MS by ale tento přístup s největší pravděpodobností vedl k nežádoucímu ovlivnění ionizace analytu a postupné kontaminaci detektoru. K eliminaci vlivu železa se v tomto případě osvědčilo promytí kolony před zahájením analýz 300 ml 1 mmol/l EDTA v 10% acetonitrilu a nastříkání 10 µl tohoto roztoku mezi jednotlivými nastříky vzorků. (Práce 4). MS detekce byla užita i v práci 2 a 3, problematika komplexace analytů s ionty železa ale

není zmíněna. Bylo nutno přijmout analogická opatření i při kvantifikaci, resp. identifikaci metabolitů, Bp4eT?

2. Z 2. a 3. práce vyplývá, že substance Bp4eT sestává především ze Z izomeru. V aprotických rozpouštědlech, jakými jsou acetonitril a dimetylsulfoxid, probíhá ustavení rovnováhy mezi oběma izomery patrně velmi pomalu. Při studiu metabolismu in vitro byla reakční směs inkubována po dobu 60 min od přidavku roztoku Bp4eT v jednom ze zmíněných aprotických rozpouštědel. Testovali jste, jak rychle se ustavuje rovnováha ve vodném prostředí?

Závěr:

Mgr. Stariat prokázal svou schopnost samostatné vědecké práce. Osvojil si řešenou problematiku a dospěl k novým vědeckým poznatkům. Ty prezentoval v recenzovaných zahraničních časopisech. Doporučuji tudíž, aby disertační práce byla přijata k obhajobě jako podklad pro udělení vědecké hodnosti PhD.

V Hradci Králové dne 30. 4. 2012

Ing. Luděk Šišpera, CSc.
Ústav lékařské biochemie, Ústav fyziologie
Universita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové.