

Posudek disertační práce

Využití technik HPLC a UHPLC-MS/MS pro klinický výzkum

Autorka: Mgr. Kateřina Kučerová

Vedoucí disertační práce: doc. PharmDr. Ludmila Matyssová, Ph.D.

Konzultantka disertační práce: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Oponent: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Úvodem svého posudku bych chtěl prohlásit, že nejsem v konfliktu zájmů a shoda přijetí s doktorandkou je čistě náhodná.

Disertační práce Mgr. Kateřiny Kučerové je sepsána celkem na 116 stranách a je doplněna přílohou, která zahrnuje publikované práce a manuskript v recenzním řízení. Mgr. Kateřina Kučerová je první autorkou tří prací (2 experimentální, 1 přehledová), které se zabývají 1) stanovením omeprazolu v suspenzním léčivém přípravku připravovaném v lékárně FN Motol a 2) využitím retinolu jako markeru časného poškození ledvin. Články byly publikovány v zahraničních časopisech (Trends in Analytical Chemistry, Journal of Chromatography A a Analytical Methods) se souhrnným impakt faktorem větším než 13. Na publikaci, která je v recenzním řízení a nesouvisí s disertační prací je Mgr. Kučerová spoluautorkou.

Výsledky experimentální práce byly prezentovány také formou přednášek na čtyřech ročních Postgraduální a Postdoktorantské vědecké konference na FaF UK v Hradci Králové a formou plakátových sdělení na šesti konferencích včetně zahraničních. Na dalších pěti plakátových sdělení byla doktorandka spoluautorkou. Kateřina Kučerová byla členkou řešitelského kolektivu dvou interních grantových projektů FN HK a je spoluřešitelkou grantu Ministerstva zdravotnictví ČR, projektu STARSS a projektu PERSONMED.

Cílem předložené disertační práce bylo 1) validovat metodu pro stanovení omeprazolu v individuálně připravovaných suspenzích a vyhodnotit jejich fyzikální stabilitu; 2) vyvinout a validovat metodu pro současné stanovení retinolu a kreatininu ve vzorcích moči.

Teoretická část práce obsahuje několik logických celků. V prvním jsou shrnuty fyzikálně-chemické a farmakologické vlastnostech omeprazolu. Dále se autorka zabývala suspenzemi jako lékovou formou a možnostmi chromatografického stanovení omeprazolu v různých lékových formách (suspenze, tablety, tobolky a pasta). Druhá část teoretického úvodu je věnována retinolu a jeho klinickému významu. V této části byla také charakterizována moč jako biologická matrice pro současné stanovení retinolu a kreatininu. Dále je uvedena literární rešerše zahrnující stanovení retinolu a kreatininu a přehled způsobů úpravy vzorku před analýzou. Poslední část teoretického úvodu je věnována validaci analytických/bioanalytických metod dle mezinárodních směrnic.

Disertační práce je zakončena závěrem a seznamem použité literatury čítající celkem 131 citací. Před přílohou práce je uveden ještě souhrnný seznam publikací, přednášek, plakátových sdělení a zapojení doktorandky do řešení grantových úkolů. Mgr. Kateřina Kučerová absolvovala v září 2019 stáž na Katedře analytické chemie, Jagellonské univerzity v Krakově.

Disertační práce je jako celek přehledná. Překlepů se v práci objevuje jen málo (např. str. 50 – enviromentální; str. 55 – v celé oblasti analytické chemii). Z formálních připomínek dále uvádím nejednotné citování použité literatury (velká/malá písmena v názvech časopisů; nepoužívání zkratk časopisů, nesprávné citování webových zdrojů apod.) a dle mého názoru mohl být zvolen lepší název práce.

Je také nutno podotknout, že ve snaze zestručnit text jsou některé formulace nevhodné a výsledná informace je tak zkreslená, což je z mého pohledu škoda vzhledem ke kvalitě publikovaných prací. Částečně je toto také způsobeno i nevhodným překladem či zestručněním původního textu (vynechání části věty; záměna slov), např. str. 51 – „povrchově porézní částice vykazují lepší účinnost bez potřeby vysokého tlaku díky zlepšené vířivé difúzi, ...“; str. 52 – „v poslední době bylo zavedeno velké množství chemismů, včetně HILIC“; str. 55 –

„metody LC-MS jsou notoricky známé pro svou složitost, jednak kvůli instrumentaci, ale také kvůli tomu, že jsou často využívány k analýze komplexních vzorků“; str. 59 – „posun na ose y“; str. 69, tabulka 5 – „koncentrace příměsí v mobilní fázi“; str. 83 „výťažnost suspenzí“ apod. Těchto formulací se mohla autorka dle mého názoru vyvarovat.

Na základě teoretického úvodu a autorčina komentáře bych chtěl v rámci diskuse poprosit o odpovědi/komentáře na následující dotazy:

Str. 20 – jakým způsobem se vyrábí léčivé přípravky? Jakým způsobem se obecně dělí nečistoty v účinných látkách a léčivém přípravku?

Str. 49 – jaké vidíte uplatnění miniaturizovaných extrakčních technik v klinické praxi?

Str. 55 – co znamená termín kritická separace? Prosím o vysvětlení poslední věty na této stránce týkající se nečistoty a selektivity.

Str. 56 – prosím o vysvětlení prvního odstavce na této straně týkající se selektivity metody. Prosím také o vysvětlení věty: „Pokud je použita LC-MS metoda, je doporučeno stanovit míru vlivu interferující látky porovnáním molekulových hmotností látek.“ Následující věta také není z věcného hlediska správně a neodpovídá textu návrhu normy ICH.

Str. 62 – máte zkušenost s hodnocením matricových efektů v „umělé“ matrici?

Str. 67-68 – jaký signál analytu odpovídající (LOD/LOQ) v porovnání s blankem?

Str. 69 – tabulka 5 – prosím o komentář k parametru konečné složení vzorku, který je nastříkovan.

Str. 77 – proč jste se zabývala separací nečistoty D a omeprazolu?

Str. 79 – obr. 15 – na základě čeho byla pro další optimalizaci vybrána kolona s C18 stacionární fází?

Str. 80 – jak velké rozdíly byly v odezvě omeprazolu při pH 7,6 a 8,0?

Str. 81 – tabulka 9 – jak bylo počítáno rozlišení a jak byla hodnocena selektivita?

Str. 86 – jakou pipetu jste použili pro přídavek 5,83 µl vnitřního standardu? Bylo nezbytné přidávat toto množství? Čemu odpovídá pík s podobným časem jako kreatinin na chromatogramu retinolu?

Str. 91 – obr. 22 – filtrace není extrakce; bylo pro vás překvapivé, že použití vody ani octanového pufru nevedlo k extrakci retinolu? Jak si vysvětlujete interference po extrakci hexanem, které ovlivňovaly stanovení kreatininu?

Str. 92 – tabulka 11 – rozlišení v případě kreatininu – čeho se týká?

Str. 95 – plynou z tabulky 14 nějaké klinické závěry?

Závěrem je třeba říct, že navzdory uvedeným výtkám přinesla disertační práce nové poznatky týkající se fyzikální stability suspenzí obsahující omeprazol připravovaných ve FN Motol. Dále práce přináší metodu pro stanovení retinolu jako markeru časného poškození ledviny zejména u pacientů s nádorovým onemocněním. Výzkum v této oblasti nadále pokračuje a jsou shromažďovány vzorky pro další klinický výzkum. Mgr. Kateřina Kučerová prokázala schopnost vědecky pracovat a její výsledky jsou z praktického hlediska cenné, což dokládají i publikace v prestižních zahraničních časopisech s IF. Na základě výše uvedených skutečností mohu konstatovat, že předložená disertační práce Mgr. Kateřiny Kučerové splňuje požadavky kladené na tento typ prací, a proto ji mohu doporučit přijmout k obhajobě.

V Hradci Králové, 31. 7. 2020

doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy
Farmaceutická fakulta UK