



Univerzita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta

Ústav farmakologie

100 34 Praha 10, Ruská 87

tel.: 267 102 405

fax: 267 102 461

<http://www.lf3.cuni.cz/farmakologie>

Posudek doktorandské disertační práce ing. Lukáše Chytila „Chirální a achirální chromatografie ve farmakologii a toxikologii“

Předložená disertační práce má standardní uspořádání, 70 stran textu je věnováno rekapitulaci vlastní práce a shrnuje motivaci práce, základní principy, metodiku, vlastní výsledky a v diskuzi jsou rozebrány a interpretovány dosažené poznatky. Připojeno je dalších 7 publikací doktoranda, kde jsou detailně rozebírány jednotlivé dílčí výsledky shrnuté ve vlastní disertační práci.

Kvalita publikovaných prací je vysoká – z pěti prací, ve kterých je doktorand prvním autorem, byly 4 publikovány v mezinárodních časopisech s IF v rozmezí 2,777 až 3,411, celkový IF 13,413. V další práci, kde je doktorand spoluautorem, je IF 1,671.

Dizertační práce se zabývá třemi oblastmi: 1) *stanovením hladiny tramadolu a jeho aktivního metabolitu – stereoisomeru pro určení metabolického fenotypu jak pro klinické monitorování účinku léku, tak pro screening typu aktivity CYP2D6,*
2) *stanovením hladin nejběžnějších antihypertenziv k určení compliance hypertoniků a*
3) *stanovením hladin benzodiazepinů a jejich metabolitů v moči pro toxikologické potřeby.*

Společným jmenovatelem je hledání optimálních analytických metod ke stanovení hladin mateřské látky či metabolitů (často typu enantiomeru) pomocí chromatografických metod. Výsledky práce tak mají přímý dopad pro praxi.

Prvou částí je *chromatografická analýza tramadolu a jeho aktivních metabolitů – desmetyltramadolu s chirální separací aktivnějšího stereoisomeru O-desmetyltramadolu (ODT)*. K bioaktivaci tohoto enantiomeru, který je velmi pravděpodobně zodpovědný za vlastní analgetický účinek, je zapojen výrazně polymorfní isoenzym CYP2D6. Při deficitu této oxidázy – u pomalých metabolizátorů – se můžeme setkat se selháním analgetického účinku tramadolu na podkladě nedostatečné biokonverze proléčiva. Poměru tramadol/ODT lze tak užít nejen k terapeutickému monitorování pro klinické účely, ale též ke stanovení genotypu/fenotypu/ isoenzymu CYP2D6. Vzhledem k tomu, že bioaktivace probíhá pod taktovkou pouze CYP2D6, lze tento poměr užít k testování enzymové aktivity pro potřeby farmakogenetického testování. Ve vlastní práci bylo stanovení poměru tramadolu/ODT užito k terapeutickému monitorování efektu tramadolu u dětí na jednotce intenzivní péče. Frekvence zjištěných fenotypů pomalých a středních metabolizátorů na základě výše uvedeného poměru i další ověření předpokladu genotypizací odpovídala frekvenci v naší populaci. Navržený test tak lze aplikovat jako screening fenotypu CYP2D6.

Druhou oblastí, klinicky velmi významnou, je *chromatografické stanovení antihypertenziv v séru k průkazu terapeutické spolupráce léčených hypertoniků*, tj. dodržování předepsaného léčebného postupu. Autorem byla zavedena metodika stanovení 13 nejběžnějších antihypertenziv (či jejich metabolitů) ze skupiny beta-blokátorů, alfa-blokátorů, blokátorů kalciového kanálu,

diuretik, sartanů, inhibitorů ACE a centrálně působících antihypertenziv. Současně byla vypracována metodika optimálního odběru krve podle farmakokinetických vlastností jednotlivých léčiv. Sledování compliance, resp. v daném případě spíše non-compliance bylo uskutečněno v souboru 215 hypertoniků, u kterých léčba vedená odborným lékařem (v ambulantním zařízení) selhávala a kteří byli odesláni na specializované pracoviště v rámci III. interní kliniky 1. LF UK Praha.

Provedená analýza výsledků ukazuje na velmi nízkou spolupráci nemocných v tomto specifickém souboru nemocných nedostatečně odpovídajících na doporučenou léčbu. Získaná data jsou závažnější: pouze při podání jednoho či dvou antihypertenziv bylo dosaženo uspokojivé spolupráce (u 83, resp. 76% bylo doloženo užití léčiva), podání tří léčiv vedlo k poklesu spolupráce na 54% a více antihypertenziv na 40%. Překvapivě vyšší spolupráce byla pozorována u mužů než u žen, závislost na věku nebyla zjištěna. Bude-li možno využít takového terapeutického monitorování v běžné praxi léčby hypertenze, bude metoda velkým přínosem pro kliniku.

Poslední část disertace se věnovala stanovení optimálního analytického přístupu k rutinnímu *vyšetření benzodiazepinů a jejich metabolitů v moči pro potřeby toxikologické*. Stanovení bylo provedeno imunochemicky a chromatograficky. Pro případné neshody bylo pátráno po příčině. Ta byla dána zkříženou reaktivitou s jinou medikací. Práce doložila příznivější parametry pro nově navrženou analytickou metodu. Užitá chromatografická LC-MS/MS analýza se ukázala jako optimální a bylo doporučeno její zavedení do rutinní praxe.

Za nesporné klady velmi pěkné práce pokládám především zavedení chirální, tedy stereoselektivní analýzy metabolitů léčiv. Stanovení enantioisomerů pomůže v odhadu vlastního působení aktivního metabolitu či případného toxického působení degradačních produktů. Rovněž zavedení rutinního monitorování hladiny běžných antihypertenziv pro určení spolupráce nemocných je z klinického hlediska velmi cenné. Také třetí oblast – stanovení benzodiazepinů – má přímý přínos v toxikologii.

K interpretaci práce mám jednu malou připomínku: je nutno mít na paměti, že testovaná skupina hypertoniků nereprezentuje obecný vzorek populace, ale nemocné primárně vybírané pro nízkou odpověď na doporučenou antihypertenzní léčbu. Proto nelze zevšeobecňovat získané nálezy. Rovněž počty stanovení zatím nejsou dostatečně velká pro potřeby další podrobnější podskupinové analýzy.

Na doktoranda mám dvě otázky. Prvou je překvapivě vysoká nespoupráce nemocných léčených sartany (losartan a telmisartan) – 38% proti léčeným inhibitory ACE (perindoprilem či ramiprilem) – 21%. Přitom antihypertenziva ze skupiny sartanů patří k nejlépe tolerovaným léčivům, naopak u inhibitorů ACE je výskyt nežádoucích účinků častější. Je možno vysvětlit jen malým počtem stanovení (řádově tři desítky v každé skupině)? Nepodíleli se jiné faktory – doplatek na lék, větší počet multikombinací v sartanové skupině a pod?

Druhá otázka je praktická. Jaké jsou ekonomické náklady na stanovení analýz hladiny antihypertenziv, je možnost případné úhrady z prostředků veřejného zdravotního pojištění?

Závěr: Doporučuji velmi kvalitní doktorandskou práci k dalšímu doktorandskému řízení. Jednotlivé části práce doktorand publikoval jako prvý autor ve čtyřech člancích v časopisech s IF 2,8 až 3,4.

V Praze 5.3.2011

prof. MUDr. Jan Bultas, CSc.
Farmakologický ústav 3. LF UK, Praha

