

Posudek na doktorskou disertační práci

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

Autor: Mgr. Jan Bureš
Školitel: doc. PharmDr. Petra Štěrbová, Ph.D.
Oponent: doc. Ing. Miloš Hroch, Ph.D.

Předložená disertační práce se zabývá vývojem a validací LC-UV a LC-MS metod pro stanovení vybraných chelátorů železa. Metody jsou následně využity pro další výzkum jako je např. ověřování vztahu struktura-aktivita při vývoji nových chelátorů a jejich in-vitro a in-vivo hodnocení.

Lze konstatovat, že chelátory železa patří mezi perspektivní skupinu látek, která nalézají využití při zvládnání některých patologických stavů související s homeostázou železa, nebo prooxidativním potenciálem v případě volných železnatých iontů. Vzhledem k tomu, že železo jako takové patří mezi velmi významné anorganické složky organismu, je třeba nalézt takové chelátory, které pomohou ve zvládnání daných patologií, nicméně nebudou negativně ovlivňovat fyziologické procesy, ve kterých má železo významnou roli. Jedná se tedy o poměrně náročný úkol. Abychom byly schopni odpovědět na mnohé otázky, týkající se osudu látek v organismu, ověřili vztah mezi jejich strukturou a aktivitou, nebo zjistili způsob jejich biotransformace, neobejdeme se bez spolehlivých analytických nástrojů, které nám pomohou na tyto otázky odpovědět. Z tohoto důvodu jsou chromatografické a hmotnostně spektrometrické metody nepostradatelnými nástroji při vývoji nových léčiv.

Předložená disertační práce má celkem 87 stran + přílohy a je sepsána formou souboru komentovaných prací. Rozsah a členění disertace odpovídá zvyklostem a běžnému standardu. Z celkového rozsahu je 39 stran věnováno teoretické části, dále následuje experimentální část o 17 stranách věnující se diskusi vývoje metod a prováděného výzkumu, který je doložen v přílohové části publikacemi, kterých je celkově šest. Všechny práce byly otištěny v časopisech s impakt-faktorem (IF). Z těchto prací je předkladatel na dvou z nich hlavním autorem a na čtyřech spoluautorem. Mimo toho je předkladatel spoluautorem 3 dalších publikací vydaných v časopisech s IF, které však nejsou v předložené dizertaci diskutovány, nicméně s jejím zaměřením úzce souvisí.

Cíle práce autor rozdělil do dvou základních skupin. V prvním tematickém bloku se věnoval látce salicylaldehyd isonikotinyl hydrazon (SIH) a jejímu proléčivu boronyl salicylaldehyd isonikotinyl hydrazonu (BSIH). Dále se pak v této části věnoval novému derivátu s označením HAPI ((E)-N'-(1-(2-hydroxyfenyl)ethyliden) isonykotinohydrazid a jeho boronylovému derivátu BHAPI.

V druhém tematickém bloku pak studoval dexrazoxan (DEX) s jeho metabolitem označeným ADR-925 a dále pak nový analog dexrazoxanu syntetizovaný na Farmaceutické fakultě UK HK s označením JR-311.

Obecné připomínky k textu práce

Velmi pozitivně na předložené práci hodnotím rozsah výzkumu a její multioborové zaměření spojující vývoj inovativních bioanalytických metod a jejich následnou aplikaci při preklinickém testování nových potencionálních léčiv ze skupiny chelátorů železa. Z tohoto pohledu za velmi významnou považuji např. spolupráci s pracovištěm Lékařské fakulty v Hradci Králové. Zde byl předkladatel členem týmu, který se zabýval objasněním skutečného molekulárního základu funkce dnes běžně používaného chelátoru železa, dexrazoxanu.

Moje výhrady k předložené práci se v zásadě týkají pouze zpracování textové části. Některé pasáže jsou sepsány způsobem, který znesnadňoval čitelnost a pochopitelnost textu. Domnívám se, že významné poznatky, které tato práce přinesla, v předloženém textu někdy trochu zanikají.

Dále v dizertaci postrádám ucelený seznam použitých zkratk, který by pomohl nezasvěcenému čtenáři v lepší orientaci v textu. Zejména v abstraktu je používání zkratk bez předchozího vysvětlení poměrně nešťastné.

Specifické připomínky k textu práce

Strana 11-13. V úvodní části na uvedených stranách postrádám odkazy do literatury. Např. v souvislosti s původními i novými poznatky ohledně kardioprotektivních účinků DEX.

Strana 11. Autor práce zmiňuje přípravu proléčiv. Pokud v této souvislosti budeme hovořit o přeměně (pro)léčiva v živém organismu, bylo by vhodné formulaci „... *odolnější vůči rozkladu v biologickém materiálu ...*“ nahradit například formulací „*odolnější vůči biotransformaci*“ nebo „*odolnější vůči rozkladu v organismu*“.

Strana 19. Kapilární spoje kolonu od zbytku systému neoddělují, ale s ním spojují.

Strana 19. Důležitost kolonového termostatu podtrhuje spíše fakt, že teplota více či méně ovlivňuje separaci látek. Snížení viskozity mobilní fáze s rostoucí teplotou a tedy i snížení zpětného tlaku, jak zmiňuje autor, má svůj nezpochybnitelný význam, nicméně udržení stabilní teploty během separace je vážnějším důvodem, proč kolonové termostaty využíváme.

Strana 22. Při chemické ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) nezachováváme, ale vytváříme pseudomolekulární ionty $[M+H]^+$ nebo $[M-H]^-$.

Strana 34. Vliv pH je pro extrakci z kapaliny do kapaliny naprosto zásadní, jak správně autor poznamenává, nicméně v práci by mělo být uvedeno, že to platí pouze pro látky s acidobazickými vlastnostmi. U látek které tyto vlastnosti postrádají je vliv pH nulový.

Strana 34. Nesouhlasil bych zcela s názorem, že L-L extrakce je pracná a zdlouhavá. Při vhodném uspořádání lze docílit daleko efektivnějšího zpracování vzorků, a vyšší čistoty než např. při SPE extrakci. Dále je také možné využít nového trendu L-L extrakce, tzv. SLE extrakce (Supported Liquid Extraction) s kapalnou fází zakotvenou na vhodném inertním nosiči. Efektivita i rychlost zpracování vzorků v tomto případě dále narůstá, nicméně s cenou se již bohužel dostáváme do oblasti SPE extrakce.

Strana 42. Z textu pojednávajícího o ověřování matričních efektů není pro nezasvěceného čtenáře zřejmý velmi podstatný fakt, že vzorek určený k hodnocení maticového efektu je připravován přidávkou čisté látky do vzorku blankové matrice, která byla předem upravena způsobem, který bude používán při přípravě vzorků.

Náměty do diskuze

Strana 11. Jaký je vztah zvýšených hladin železa k rozvoji neurodegenerativních poruch (Alzheimer, Parkinson)?

Strana 21. V čem spočíval problém užití hydridových kolon (silikagel typu C) při analýze chelátorů železa?

Strana 30. Proč je vhodné, aby monoisotopická hmota SIL-IS byla o 4-5 Da vyšší, než stanovované látky?

Strana 50. U derivátu BSIH autor uvádí, že bor je navázán na benzenové jádro prostřednictvím esterové vazby, nicméně já zde žádnou esterovou vazbu nevidím. Prosím o vysvětlení.

Strana 52. EDTA je poměrně exotickým aditivem mobilní fáze. Jakým způsobem jste zjistil, že právě EDTA bude mít tak dramatický efekt na zlepšení reprodukovatelnosti výsledků?

V práci uvádíte, že v některých případech postačovalo promýt chromatografický systém 2 mM EDTA před analýzou a nemusela být přidávána jako aditivum do mobilní fáze. Zjišťovali jste v jakém intervalu je třeba tento úkon provádět, aby v případě analýzy většího počtu vzorků nedocházelo ke zhoršování parametrů metody?

Závěr:

Na předložené dizertační práci oceňuji způsob, jakým se autor zhostil velmi náročného řešení předloženého multioborového problému. Moje připomínky k textu nijak nesnižují její význam. Předkladatel prokázal schopnost samostatné vědecké práce, jak dokazuje množství kvalitních publikací v respektovaných zahraničních časopisech s IF.

Autor se taktéž aktivně účastnil konferencí, včetně zahraničních, absolvoval dvě stáže, z čehož jedna byla zahraniční a byl hlavním řešitelem či spoluřešitelem několika grantových projektů. Na základě výše uvedeného se domnívám, že předkladatel více než dostatečně splnil všechny povinnosti a předpoklady pro získání doktorského titulu a proto předloženou práci doporučuji k obhajobě.

V Hradci Králové dne 16.4. 2018

.....
doc. Ing. Miloš Hroch, Ph.D.
Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav lékařské biochemie