

OPONENTSKÝ POSUDEK DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor: Mgr. Ivo Vrobel
Název: Monitorování lékových hladin a studium biotransformace tyrozinkinázových inhibitorů používaných při léčbě chronické myeloidní leukémie.
Školitel: doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie
Fakultní nemocnice Olomouc
Oponent: doc. RNDr. Petr Barták, Ph.D.
Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta
Univerzita Palackého v Olomouci

Disertační práce Mgr. Ivo Vrobela „Monitorování lékových hladin a studium biotransformace tyrozinkinázových inhibitorů používaných při léčbě chronické myeloidní leukémie.“ je zpracována na 129 číslovaných stranách, obsahuje 34 obrázků, 6 tabulek a 198 literárních odkazů.

Práce je členěna obvyklým způsobem. Teoretická část (44 stran, včetně úvodu) je reprezentována literárním přehledem logicky rozčleněným do čtyř částí, zaměřených na (i) základní charakterizaci chronické myeloidní leukémie, (ii) tyrozinkinázové inhibitory a jejich využití v léčbě chronické myeloidní leukémie, (iii) analytické metody pro terapeutické monitorování lékových hladin tyrozinkinázových inhibitorů a (iv) biotransformaci tyrozinkinázových inhibitorů. Přehledně jsou uvedeny cíle disertační práce (2 strany), jednak v obecnější rovině a následně konkrétní dílčí cíle řešení disertační práce, které se dají shrnout do dvou tematických okruhů zaměřených na vývoj a validaci vysokopropustné metody pro terapeutické monitorování lékových hladin tyrozinkinázových inhibitorů a na studium metabolizace a identifikaci nových metabolitů imatinibu. Experimentální část (12 stran) podává podrobný přehled operačních postupů, použitých přístrojů, chemikálií a materiálu, protokolů pro přípravu vzorků a zpracování dat apod.

Následující kapitola „Výsledky a diskuze“ (36 stran) představuje nejdůležitější část disertační práce; jsou zde uvedeny veškeré dosažené výsledky, jejich interpretace a vyvozené závěry. Podrobně je popsán vývoj a validace analytické metody pro stanovení koncentrací tyrozinkinázových inhibitorů s využitím on-line spojení extrakce tuhou fází (SPE) s tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Metoda byla pečlivě validována, přesvědčivě je doložena shoda výsledků nově vyvinuté metody a doposud užívané LC-MS/MS metody. Hlavní výhodou nově vyvinuté metody je kratší čas analýzy (29 sekund) a tedy vyšší propustnost vzorků. V druhé části disertační práce je popsáno zdařilé využití spojení kapalinové chromatografie s vysokorozlišující hmotnostní spektrometrií pro necílenou analýzu a identifikaci nových metabolitů imatinibu v krevní plazmě. Díky kombinaci chromatografické separace, fragmentačních experimentů a měření hmotnostních spekter s vysokým rozlišením (Orbitrap) bylo objeveno a ve většině případů identifikováno nebo alespoň blíže charakterizováno celkem 24 nových, dosud nepopsaných, metabolitů imatinibu. Vyzdvihnout je možné např. elegantní využití měření s vysokým rozlišením k prokázání přítomnosti izotopu síry ^{34}S a odhalení nových cysteinových konjugátů mezi metabolity nebo zdůraznění souvislosti reaktivních metabolitů s toxicitou imatinibu. Profilování metabolitů by

se tak mohlo stát cenným nástrojem k objasnění, případně potlačení, toxicity a nežádoucích účinků nových léčiv. Dosažené výsledky jsou ještě jednou shrnuty v závěru práce (2 strany). Připojen je i stručný výhled možností dalšího rozvoje tématu (2 strany), seznam prací autora a seznam použité literatury. Samozřejmostí je český i anglický souhrn a seznam zkratk na začátku disertační práce.

Disertační práce se zabývá analýzou zajímavého souboru vzorků různými metodami, vhodně volenými podle zamýšlených cílů a následného využití získaných dat. Výsledky dosažené během přípravy disertační práce považuji za zásadní a přínosné pro další rozvoj oboru. Veškerá experimentální data jsou přesvědčivě doložena, řádně zpracována a interpretována. Prakticky všechny výsledky již byly odpovídajícím způsobem publikovány, příslušné publikace jsou uvedeny v samostatném seznamu publikací, přínos autora je ve všech případech zřejmý a nesporný. Cíle disertační práce jsou formulovány jasně a srozumitelně, odpovídají současnému stavu poznání a jejich dosažení je v práci dobře dokumentováno. Práce je téměř prosta překlepů a formálních nedostatků (ojedinělým příkladem drobné formální nepřesnosti by mohl být obrázek 24 na str. 85, kde patrně v naznačeném fragmentačním schematu chybí methylová skupina v poloze N4), grafická i stylistická úroveň práce je velmi dobrá, práce je přehledná a dobře uspořádaná. Jako námět do případné diskuse si dovoluji připojit dva dotazy z pohledu analytické praxe:

❖ Na str. 26 se v souvislosti s využitím izotopicky značených standardů uvádí: „Předpokladem jejich použití k eliminaci vlivu matricových efektů je, že jejich ionizace je ovlivněna stejně jako ionizace analytů. Nicméně, nelze na to spoléhat ve všech případech a vždy je třeba matricové efekty pečlivě vyhodnotit.“ Toto tvrzení je nesporně pravdivé. V běžné analytické praxi jsou ovšem izotopové standardy (zvláště ve srovnání s běžnými typy neznačených standardů) považovány za „téměř ideální“. Setkal jste se během vlastní experimentální práce s nějakým „neideálním“ chováním izotopových standardů?

❖ Na str. 52 se uvádí, že pro oplach jehly po nadávkování vzorku byl použit acetonitril a voda. Vzorky přitom byly rozpuštěny ve směsi methanolu a vody. Byly pro použití acetonitrilu jako oplachového rozpouštědla nějaké relevantní důvody?

Předložená disertační práce svědčí o dobrém zvládnutí zajímavé a aktuální problematiky. Text je zpracován s velkou kompetencí a kritickým nadhledem. Práce svou koncepcí, rozsahem i způsobem zpracování splňuje kriteria kladená na tento typ prací. Předloženou disertační práci **doporučuji** k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby a absolvování doktorského studijního programu doporučuji, aby byl Mgr. Ivo Vrobelovi udělen akademický titul „doktor“ (ve zkratce Ph.D.) dle § 47 zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Oponentský posudek k disertační práci Mgr. Ivo Vrobela

“Monitorování lékových hladin a studium biotransformace tyrozinkinázových inhibitorů používaných při léčbě chronické myeloidní leukémie”

Ve své disertační práci se Mgr. Ivo Vrobel věnuje bioanalýze tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) v souvislosti s léčbou chronické myeloidní leukémie (MCL). Hlavním motivem předložené práce je vývoj a validace metody stanovení užívaných TKI a jejich metabolitů s ohledem na uplatnění této metody v klinické praxi, tj. hlavním hlediskem je vysoká propustnost.

Uvedený dizertační spis je primárně založen na dvou prvoautorských publikacích (*The Drug Monit* 38 (2016) 516; *Eur J Pharm Sci* 104 (2017) 335). Spis spojuje a uceleně prezentuje výsledky získané v rámci výše zmíněného výzkumu. Autor vyčerpávajícím a přehledným způsobem prezentuje jak východiska, tak i získané poznatky studie.

Práce obsahuje minimum překlepů a ostatních mluvnických nedostatků. Žel, autor se nevyhnul odbornické makarónštině. Oponent oceňuje použití pojmu vysokopropustný jako ekvivalentu anglického *high-throughput*, nicméně časté používání slovního spojení *carry-over efekt* (paměťový či přenosový efekt) oponentovo nadšení kalí, stejně jako třeba *konfidenční interval* (interval či limit spolehlivosti) nebo sloveso *termostatovat* (temperovat). Někdy autorovi uniklo i zjednodušující vyjadřování laboratorním slengem, např. str. 82 „monoizotopický pík ^{34}S byl detekován s m/z 732,2545“, autor patrně míní, že detekovaná spécie obsahovala izotop síry 34. A když už jsme u terminologie, je dobré např. odlišovat *rozlišení* a *rozlišovací schopnost*, kde hodnotu druhého zmiňovaného autor uvádí ve své práci. Vyjma těchto menších nedostatků je obsah spisu velmi kvalitní.

Dizertant prokázal schopnost tvůrčím způsobem vědecky pracovat, získané výsledky zpracovat, diskutovat a publikovat, viz prvoautorské články v odborných recenzovaných časopisech. Mgr. Vrobel splnil dle soudu oponenta požadavky kladené na disertační práce v oboru, proto předloženou disertační práci doporučuji k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby pak navrhuji udělení akademického titulu Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

11. 9. 2018, vypracoval Jan Havliš



Otázky oponenta:

1. Kalibrační křivky na obrázku 9 na straně 63 vykazují relativně velké výseky na ordinátě. Čím si to vysvětlujete?
2. Byly matricové faktory uvedené na straně 68 stanoveny skutečně s takovou nízkou nejistotou jako naznačují počty desetinných míst, např. $78.3 \pm 14.3 \%$ či $62.4 \pm 14.2 \%$? S tím souvisí obecný postoj k uvádění počtu platných číslic, např. i u hodnot m/z ve vztahu k adekvátnosti m/z (*mass accuracy*) či u hodnot nepřeciznosti v tabulce 3 na str. 64. Jak jste zohledňoval počet platných číslic při prezentaci dat z vaší studie?
3. Nedávná práce Wojnicz *et al.*, *Ther Drug Monit* 39 (2017) 252 vyzdvihuje jejich metodou zjištěné nižší LLOQ při stanovení ve vaší studii probíraných TKI. Mohl byste srovnat vaše a jejich přístupy z pohledu významu a uplatnění v klinické praxi, časové i případně finanční náročnosti?
4. Podařilo se pokročit s identifikací s práci zmiňovaných neidentifikovaných metabolitů? Jak by šel např. mechanismus vzniku cysteinových konjugátů z obr. 17 na str. 78 ověřit?

11. 9. 2018, vypracoval Jan Havliš