



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

telefon: +420 387 771 111 (ústředna)

+420 387 775 051 (ředitelství)

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344

číslo účtu: 6063942/0800, Česká spořitelna, a.s.

www.bc.cas.cz | e-mail: bc@bc.cas.cz

Posudek habilitační práce

Název: Hmotnostní spektrometrie pro monitorování a studium chronické myeloidní leukémie

Autor: **RNDr. David Friedecký, Ph.D.**

Obor: Analytická chemie

Datum podání: Olomouc, 27. června 2016

Předložená habilitační práce představuje ucelené, logicky a přehledně uspořádané dílo, shrnující nové poznatky a vědecké výsledky v oblasti výzkumu monitorování a studia chronické myeloidní leukémie (CML) pomocí hmotnostní spektrometrie (MS), na nichž se autor zásadním způsobem podílel. Obsah práce se opírá o osm kvalitních publikací vypracovaných autorem a jeho spolupracovníky v období 2009-2016, přílohy 1-8 (dále [P1-8]), které byly publikovány v mezinárodních impaktovaných vědeckých časopisech zasahujících primárně do analytických, klinických a farmakologických oborů.

Práce shrnuje stručným a výstižným způsobem současné poznatky o chronické myeloidní leukémii, diskutuje o současném postavení hmotnostní spektrometrie v oblasti klinické analýzy, zejména využití analyzátorů trojitého kvadrupólu a orbitální iontové pasti, které autor intenzivně používá v oblasti výzkumu dědičných metabolických poruch, terapeutického monitorování léčiv, především inhibitorů tyrosinové kinasy (TKI), při studiu metabolismu léčiv a metabolomických analýzách.

V práci se velmi dobře odráží pečlivě promyšlený vývoj analyticko-biochemického výzkumu CML pod vedením prof. Tomáše Adama. Začíná logicky vývojem analytické metody založené na technologii ultraúčinné kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS), která umožňuje citlivé a robustní stanovení inhibitorů tyrosinové kinasy – zejména imatinibu (IMA) a dále preparátů druhé generace dasatinibu (DAS) a nilotinibu (NIL), velmi účinných substancí v současné léčbě CML, a tím nezbytné efektivní monitorování jejich hladin v plasmě během terapie. Zatímco v prvních studiích autor zavedl a použil již publikovanou HPLC-MS/MS metodu [P1, ref. 15], další výzkum vedl k vývoji nových metod umožňujících rutinní, dlouhodobé stanovení všech TKI v plasmě současně [P3, P2]. V práci P3 byly detailně porovnány dvě metody pro stanovení IMA a jejího hlavního metabolitu desmethyl-IMA v krevní plasmě po



extrakci směsí voda-methanol 1:10; metoda UHPLC-MS/MS, popsaná již v práci P2 a nová metoda průtokové analýzy (FIA-MS/MS). Obě metody byly validovány podle doporučení US FDA a výsledky práce prokázaly rychlé, robustní stanovení IMA v plasmě v rozsahu koncentrací 100-5000 ng/ml. Metody byly úspěšně aplikovány v další studii k monitorování IMA v plasmě při chemoterapii pacientů s CML, jak pacienti spolupracují s lékařem během léčby [P4] a k dlouhodobému sledování molekulární/cytogenetické odpovědi na léčbu – k individualizaci léčby [P1].

V práci [P5] rozšířil autor metodu průtokové FIA-MS/MS k současnému stanovení IMA, tak TKI druhé generace (NIL a DAS) pomocí deuteriem značených vnitřních standardů (metoda izotopického zředování). Vzhledem k nízkému ionizačnímu průřezu DAS byla k jeho detekci s výhodou využita schopnost třetího kvadrupólu fungovat jako lineární iontová past a produkovat ionty 3. generace v tzv. MRM³ režimu hmotnostního spektrometru QTRAP (Sciex), což významně zvýšilo selektivitu a o dva řády citlivost měření DAS v plasmě. Vlivy matrice (zesílení, suprese) byly minimalizovány přidávkem příslušného deuterovaného standardu, desetinasobným zředěním vzorku a malým objemem dávkovaného extraktu (0.5 µl). To současně umožnilo měřit velké série vzorků (> 1000 vzorků) při terapeutickém monitorování TKI bez nutnosti odstavení analytického systému.

V další zajímavé studii [P7] autor zkoumal potenciál on-line extrakce TKI látek tuhým sorbentem (SPE) s využitím přepínacích ventilů a MRM režimu hmotnostního spektrometru a jejich rychlému stanovení v plasmě. Jako hlavní přednost tohoto analytického přístupu se jeví možnost plné automatizace a rychlost analytického procesu. Omezení však představuje nutnost manuální deproteinace vzorku organickým rozpouštědlem nebo silnou kyselinou před aplikací on-line SPE, což představuje nejdelší krok celé analýzy. Rychlou on-line SPE MS/MS analýzu dále komplikují podstatně větší vliv matricových efektů (zejména koeluce fosfolipidů) a pozorované paměťové efekty při opakovaném používání sorbentu (carry-over, kontaminace sorbentu vzorkem z předchozí analýzy), které si vynutily prodloužení doby eluce TKI ze sorbentu, další ředění vzorku a vložení analýzy jednoho slepého vzorku (blank). Tato nutná opatření vedla k řádovému snížení meze stanovitelnosti metody ve srovnání s vypracovanou metodou UHPLC-MS/MS. Zvalidovaná SPE MRM MS/MS metoda přesto plně umožňuje terapeutické monitorování TKI léčiv obdobně jako metody popsané v publikacích [P1-P5].

Studium metabolismu IMA v organismu představuje další důležitý krok ve výzkumu CML, její léčby a je předmětem práce P6. Detailní výzkum vyskytujících se metabolitů IMA v plasmě byl realizován pomocí technologie HPLC – vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS) Orbitrap. Celkem bylo nalezeno na

90 metabolitů IMA 1. a 2. fáze biotransformace, 23 různých modifikací IMA, nejčtenější jsou produkty oxidace, oxidace s demethylací a dioxidace. Studie [P6] umožnila učinit si celkový obrázek o metabolizaci IMA v krevní plazmě, o hlavních vyskytujících se metabolických produktech, které tak bude možno sledovat při dalším biochemickém výzkumu CML, v klinických terapiích a při hodnocení účinku léčby.

Habilitační práci završuje studie [P8], která velmi názorně dokumentuje dlouhodobý, systematický vývoj metabolomických přístupů autorem a jeho spolupracovníky. Recentní práce navazuje logicky na předchozí bioanalytická měření TCI, zejména IMA a jeho metabolitů v plasmě. Zkoumá cíleně a velmi detailně metabolické profily v leukocytech a krevní plazmě pacientů s čerstvě diagnostikovanou CML a ve skupině pacientů dlouhodobě léčených pomocí TCI.

Ve spolupráci s hemato-onkologickou klinikou na FN Olomouc nashromáždil autor ucelený soubor vzorků pacientů léčených TKI a hydroxymočovinou (HU), 67 vzorků plasmy, 56 leukocytů [P8]. Základ úspěšné metabolomické analýzy představuje robustní metabolomická analytická platforma založená v chemické části na pečlivě ověřeném postupu extrakce metabolitů ze vzorku a na instrumentální analýze nejčastěji využívající některou z technologií UHPLC-MS. Pro cílené sledování konkrétních metabolických profilů zavedl autor metabolomickou platformu založenou na současné separaci polárních a iontových metabolitů na HILIC fázích s vázanými aminopropylovými skupinami [ref. 62, Rabinowitz et al; P8, ref. 11, Asara et al]. V leukocytech bylo detekováno na 146 metabolitů [P8; uváděn počet 149, str. 44], v plasmě 123 metabolitů [P8; 124, str. 44]. Plochy jejich píků vyhodnocené programem MultiQuant byly následně ukázkově zpracovány pomocí nejnovějších chemometrických postupů, které se osvědčují při vytěžování metabolomických dat.

Byla aplikována metoda korekce dat LOWESS na poolované QC vzorky, logaritmická transformace a centrování. Hodnoty p-value byly určeny pomocí t-testu a provedena Bonferroniho korekce. Data pak byla vizualizována pomocí multivariačních metod, neřízené PCA (použité diagramy komponentních skóre, Obr. 5.2, redukce dimenze dat, hledání významných rozdílů mezi vzorky/skupinami) a řízené OPLS-DA (diagramy S-plot, Obr. 5.3, hledání diferencujících metabolitů mezi dvěma skupinami pomocí diskriminační analýzy). V příloze práce P8 je navíc pro každý metabolit zobrazen krabicový graf (studie nabízí více jak 500 grafů pro vyhodnocení dat a k diskusi), které umožňují znázornit změny v zastoupení metabolitu v jednotlivých skupinách. Na Obr. 5.4 (P8, Obr. 3) jsou navíc krabicový graf vybraného metabolitu zobrazen v příslušné metabolické dráze, což významně usnadňuje diskusi role metabolitu v závislosti na jeho příslušnosti k určité zkoumané skupině.

PCA analýza takto odhalila významné rozdíly mezi skupinami ND (čerstvě diagnostikovaná CML) + HU vers. CON (kontrola, zdraví jedinci) + IMA + NIL + DAS, přičemž rozdělení jednotlivých zkoumaných skupin pacientů je významnější u vzorků leukocytů než u plasmu. Při hodnocení výsledků je přitom nezbytné si uvědomit, že celkový metabolický stav závisí na množství zastoupených nádorových buněk [P8, příloha, Table-S1).

Diskriminační analýza OPLS-DA umožnila vyhodnotit nejvíce diskriminující metabolity u párově srovnávaných skupinách vzorků [P8, přílohy, Table-S6 až S-24).

Pomocí krabicových grafů byla diskutována změna hladin jednotlivých zkoumaných metabolitů v leukocytech a plasmě pacientů s diagnostikovanou CML a pacientů léčených pomocí TKI. Významné změny byly pozorovány v metabolismu nukleotidů (de novo syntéza purinů, glykolýza), snížení aktivity citrátového cyklu, zvýšeného metabolismu aminokyselin (s výjimkou aspartátu), glukózy a dalších nutrientů, Obr. 5.4, [P8, příloha Box plots 1].

Ve studii [P8] byly dále pozorovány zvýšené hladiny většiny aminokyselin a snížené hladiny karnitinů se střední délkou řetězce u CML pacientů neodpovídajících optimálně na léčbu pomocí IMA, Obr. 5.5, [P8, příloha Box plots 2].

Dostupné bibliografické údaje o vědecké publikační činnosti autora (zdroj: WOS) představují více jak 40 publikací v mezinárodních impaktovaných vědeckých časopisech, více jak 355 citací (322 bez autocitací), h-index = 11. V osmi publikacích, které autor v habilitační práci diskutuje, je pětkrát prvním a dvakrát korespondujícím autorem.

Práce je pečlivě, srozumitelně napsána, obsahuje minimum pravopisných či stylistických nedostatků (př. silylace, překlep str. 14 dole) a reprezentuje ucelený soubor kvalitních vědeckých výsledků dosažených autorem, jež čtenáře a recenzenta inspirují k formulaci celé řady otázek a nových hypotéz.

Vzhledem k zaměření práce do oboru analytické chemie mohly být závěry habilitační práce rozvedeny podrobněji. Výborně provedené bioanalytické studie [P2, P3, P5, P7] přímo vybízejí ke zobecňujícímu srovnání plusů a omezení popsaných UHPLC-MS/MS, FIA-MS/MS a on-line SPE-MS/MS method v bioanalýze léčiv a odpovědi na otázku, za jakých podmínek lze uvažovat o nahrazení nejvíce používané UHPLC-MS/MS metody některou ze dvou dalších popsaných bioanalytických řešení.

Studium metabolismu imatinibu v krevní plasmě [P6] je dalším důležitým příspěvkem této práce. Zde by si otázka, na které hlavní pozorované metabolity této lékové substance je žádoucí se v budoucích studiích zaměřit, zasloužila další komentář.

Nejnáročnější a nejrozsáhlejší část této práce představuje metabolická studie [P8]. Jednotlivé, velice náročné kroky použité cílené metabolické UHPLC-MS/MS analýzy byly pečlivě promyšleny a realizovány. Jsou založeny na nejnovějších poznatcích oboru a na sofistikovaných postupech, které používají další špičkové metabolické výzkumné skupiny.

Připomínky si zaslouží pouze popis analytických vlastností používané UHPLC-MS/MS metody. Za zvážení stála diskuse některých důležitých charakteristik použité analytické metody, které v [P8] nebyly uvedeny: retenční časy a použité MRM sledovaných metabolitů, diskuse problému separace koeluuujících metabolitů (zejména izomerů) a jejich MRM přechodů. Některé zkoumané metabolity jsou v používaných extrakčních médiích poměrně málo stabilní (např. oxalacetát, glutamin, ATP). Problém vlivu stability na jejich měření (nebyly používány vnitřní standardy) mohl být krátce okomentován.

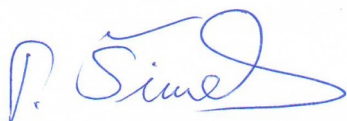
Při popisu extrakce metabolitů z leukocytů byl opomenut vhodný odkaz nebo vysvětlení, proč bylo použito právě médium MeOH-MeCl₃-voda v poměru 1:1:0.8.

Pro experimentální uspořádání metabolické analýzy má poměrně velký význam pořadí měření vzorků a způsob vkládání poolovaných QC vzorků, je-li používána korekce dat pomocí QC vzorků metodou LOWESS (LOESS). Bylo proto vhodné uvést podrobnosti o použitém postupu korekce LOWESS, a obdobně o postupu Bonferroniho korekce hodnot p-value.

Porovnání výskytu jednotlivých hladin metabolitů umožnil rozsáhlý soubor krabicových grafů v příloze [P8]. Zde by si diskusi zasloužila otázka, jak může interpretaci výsledků ovlivnit výrazně rozdílný počet změřených vzorků v porovnávaných skupinách pacientů.

Celkově předložená habilitační práce reprezentuje kvalitní soubor vědeckých výsledků a podle mého názoru splňuje požadavky na takovou práci kladené. Vytváří výborné předpoklady pro další studium chronické myeloidní leukémie a rozvoj oboru metaboliky ve výzkumných institucích v Olomouci a celé České republice.

V Českých Budějovicích dne 7 února 2017.



RNDr. Petr Šimek, CSc.

Analytická chemie a metabolika
Biologické centrum AV ČR, v.v.i.