Dr hab. Jacek Wójcikowski
Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk
Zakład Farmakokinetyki i Metabolizmu Leków
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków
tel. 12-6623389, e-mail: wojcikow@if-pan.krakow.pl

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Gonciarz-Dytman "Zastosowanie elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej do oceny wiązania leków z białkami krwi" wykonanej w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) pod kierunkiem dr hab. Marii Walczak

Wiązanie leków z białkami krwi ma istotne znaczenie dla losów substancji leczniczej w organizmie i dla jej działania farmakologicznego. Tylko niezwiązana z białkami część leku może przenikać z krążenia do receptora i być czynna farmakologicznie. Związana z białkiem część leku jest nieaktywna, nie podlega dystrybucji, nie przenika do tkanek, nie wywiera działania farmakologicznego, nie jest metabolizowana ani wydalana. Jest formą rezerwy, z której jest uwalniana w miarę zmniejszania się frakcji wolnej w organizmie. Szczególnie niebezpieczne w praktyce klinicznej jest zjawisko interakcji leków na etapie wiązania z białkami krwi. Na etapie poszukiwania nowych leków znajomość stopnia wiązania związków z białkami krwi jest pomocna w wyborze struktury wiodącej kandydata na lek. Natomiast w praktyce klinicznej wiedza tego typu służy doborowi odpowiednich dawek leku.

Poszukiwanie wysokowydajnych, szybkich i tanich metod oceny wiązania leków z białkami krwi to jeden z wielu kierunków nowoczesnych technik analitycznych. Wymogi te spełnia elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 149 stron, w tym spis piśmiennictwa (169 pozycji) oraz 44 tabele i 49 rycin. Pracę otwiera streszczenie w języku polskim i angielskim, brakuje mi natomiast dołączanego zwykle spisu skrótów. Układ pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich i składa się z części wstępnej, teoretycznej, zakończonej sformułowaniem celu pracy. Dalsze części to materiały i metodyka, przedstawienie wyników badań, omówienie wyników, wnioski, bibliografia oraz spis rycin i tabel. Przejrzystości pracy dodaje umiejętne podzielenie wymienionych części pracy na podrozdziały, co bardzo ułatwia zapoznanie się z rozprawą i jej ocenę.

W części teoretycznej Doktorantka dosyć szczegółowo przedstawiła zagadnienia dotyczące wiązania leków z białkami krwi oraz graficznych metod wyznaczania parametrów

wiązania leku z białkiem. W dalszej kolejności Doktorantka przedstawiła charakterystykę białek wiążących leki we krwi oraz omówiła wpływ wiązania leków z białkami krwi na profil farmakokinetyczny i procesy farmakodynamiczne. W końcowych rozdziałach części wstępnej dokonała przeglądu metod stosowanych w badaniach wiązania substancji z białkami krwi ze szczególnym uwzględnieniem dializy równowagowej i elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej. Na koniec Autorka przedstawiła zastosowanie wiązania substancji z białkami krwi w badaniach nad nowymi lekami i znacznikami stosowanymi w diagnostyce medycznej.

Oceniając część wstępną pragnę podkreślić umiejętność zwięzłego, a zarazem jasnego przedstawienia kolejnych zagadnień przez Doktorantkę, opartych na odpowiednio dobranym piśmiennictwie. Szkoda może jedynie, że w części wstępnej Doktorantka nie zamieściła chociażby krótkiej charakterystyki związków wybranych do badań.

Następnie Doktorantka przedstawiła cel pracy, który obejmował następujące zadania badawcze:

1. Opracowanie i walidacja metod oznaczania wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz ocena wiązania tych leków z albuminą wołową, albuminą ludzką oraz kwaśną α_1-glikoproteiną.
2. Porównanie elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej z dializą równowagową jako technik separacyjnych stosowanych w badaniu wiązania substancji z białkami krwi na przykładzie deksametazonu i prawastatyny.
3. Ocena termodynamiki procesu wiązania deksametazonu i prawastatyny z albuminą wołową i ludzką.
4. Zastosowanie elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej do badania wiązania z albuminą i kwaśną α_1-glikoproteiną związków o aktywności śródbłonkowej, takich jak pochodne nikorandylu (1-metylopirydyna i 1,4-dimetylopirydyna), kwas nikotynowy i jego pochodne (nikotynamid i N-metylonikotynamid), prekursory chlorku N-metylonikotynamidu z komponentą uwalniania tlenku azotu (C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586 i C-2590) oraz hepatoselektywne donory tlenku azotu (związki z grupy diolanów diazoniowych V-Pyrro/NO i V-Proli/NO).
5. Ocena zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi związków, a stopniem wiązania z białkami krwi.

W rozdziale 'Materiały i Metody' zostały wyszczególnione użyte do badań związki i odczynniki chemiczne. Doktorantka krótko opisała sposób przygotowania buforów oraz roztworów białek i roztworów badanych związków. Dokonała również opisu użytej do badań aparatury. Badania wykonano przy użyciu systemu do elektroforezy kapilarnej P/ACE™ MDQ firmy Beckman Coulter. Do oznaczenia stężenia frakcji wolnej deksametazonu i prawastatyny oraz związków o aktywności śródbłonkowej zastosowano elektroforezę kapilarną w trybie analizy frontalnej. Jako metodę odniesienia w badaniu zastosowano dializę równowagową oznaczając frakcję wolną związków w płynie dializacyjnym z zastosowaniem strefowej elekroforezy kapilarnej. Każdą z opracowanych metod zwalidowano zgodnie z wytycznymi FDA, ICH i EMA, obowiązującymi dla metod analitycznych, oceniając takie parametry jak: specyficzność, selektywność, liniowość metody, granica wykrywalności, dokładność metody, powtarzalność i odtwarzalność. Wyznaczenie parametrów wiązania wykonano metodą regresji nieliniowej korzystając z programu Mathematica 8.0. Ponadto, dla deksametazonu wyznaczono parametry wiązania z zastosowaniem metody Scatcharda. Wyniki przeprowadzonych badań opracowano statystycznie przy zastosowaniu odpowiednich testów (test t-Studenta oraz test U Manna-Whitneya). Do wyznaczenia in silico wybranych parametrów fizykochemicznych oraz oceny wiązania badanych związków z białkami krwi zastosowano program komputerowy ACD/I-Lab 2.0.

Przedstawiona metodyka badań świadczy o kompleksowym, bardzo nowoczesnym podejściu Doktorantki do rozwiązania założeń zawartych w celu pracy, które realizowała zgodnie z najlepszymi standardami badań w tym zakresie, a także o ogromie włożonej pracy w przebadanie aż 19 związków .

Rozdział 'Wyniki' odnosi się zarówno do opracowania i walidacji metod analitycznych (elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej, dializa równowagowa w połączeniu ze strefową elektroforezą kapilarną), które posłużyły do oznaczenia wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny jak i oceny wiązania tych leków oraz związków o działaniu śródbłonkowym z albuminą wołową, albuminą ludzką i kwaśną α_1-glikoproteiną.

Wykazano, że wiązanie deksametazonu i prawastatyny z albuminą wynosiło odpowiednio 70-90% i 40-50%. Stałe wiązania pozwalają zaliczyć deksametazon do leków o średnim powinowactwie do albuminy, a prawastatynę do leków o niskim powinowactwie do tego białka. Ponadto, przeprowadzone badania porównawcze pozwoliły uznać elektroforezę kapilarną w trybie analizy frontalnej i dializę równowagowa za techniki równocenne do badania wiązania związków z białkami krwi. Nie stwierdzono istotnych różnic w procesie wiązania deksametazonu i prawastatyny z albuminą ludzką i wołową, co wskazuje, że

albumina wołowa może być stosowana jako zamiennik albuminy ludzkiej w badaniach wiązania związków z białkami krwi. Wykazano także, iż elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej może być wykorzystana do wyznaczania podstawowych funkcji termodynamicznych i oceny termodynamiki interakcji pomiędzy związkiem a białkiem. Spośród badanych związków o aktywności śródbłonkowej tylko niektóre wiązały się z albuminą wołową (kwas nikotynowy, C-2551, C-2590, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO). Związki te różniły się zarówno stopniem jak i siłą i stechiometrią wiązania z albuminą wołową. Ponadto, badane związki wiązały się z kwaśną α_1-glikoproteiną w stopniu nie większym niż 10%. Z kolei badania in silico wskazały na zróżnicowanie właściwości fizykochemiczne badanych związków (wartości LogP, LogD, pK_a) oraz dostarczyły informacji o stopniu i sile ich wiązania z białkami krwi. Wykazano pozytywną korelację pomiędzy wyznaczoną eksperymentalnie sumą wiązania substancji z albuminą ludzką lub wołową oraz kwaśną α_1-glikoproteiną, a wartościami wyznaczonymi in silico. Podobnie wysoką korelację stwierdzono dla wiązania badanych substancji z albuminą wołową. Z drugiej strony parametry wiązania wyznaczone in silico różniły się od tych, uzyskanych doświadczalnie oraz dostępnych w literaturze.

Omówienie wyników badań nie budzi zastrzeżeń. Jest ono oparte na uzyskanych i bogato udokumentowanych rezultatach, a równocześnie umiejętnie nawiązuje do aktualnych badań innych autorów. Sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza bardzo dobre przygotowanie metodyczne i szeroką wiedzę Autorki. Być może szerszego komentarza wymagają tylko rozbieżne wartości parametrów wiązania badanych związków z białkami krwi wyznaczone in silico oraz uzyskane doświadczalnie.

Przeprowadzone badania pozwoliły Doktorantce na sformułowanie pięciu wniosków, które znajdują pełne uzasadnienie w uzyskanych wynikach badań.

Całą recenzowaną pracę charakteryzuje niezwykła staranność zarówno pod względem treści, formy, jak i poprawności językowej. Pod względem edytorskim praca została przygotowana bardzo starannie, chociaż trudno ustrzec się w tak obszernym opracowaniu różnego rodzaju potknięć redakcyjnych. Wymieniam je poniżej z obowiązku recenzenta:

- str. 67, w opisie wyników podano inny zakres dokładności metody oznaczania wolnej frakcji deksametazonu (100.84-101.56%), aniżeli zamieszczono w tabeli 4.11 (10.77-101.56%),
- str 68, w opisie wyników podano, iż precyzja pośrednia metody oznaczania wolnej frakcji deksametazonu była niższa niż 2.32%, w tabeli 4.12 wartość ta jest niższa od 2.74,
- str. 80, w opisie wyników podano, że prawastatyna wiązała się z albuminą wołową od 56.68% dla najniższego stężenia leku, w tabeli 4.23 wartość ta wynosi 54.67%,

- str 83 w opisie wyników podano maksymalne wiązanie prawastatyny z AGP na poziomie 5.83%, podczas gdy w tabeli 4.27 jest to 6.65%.

Wymienione przeze mnie uwagi nie umniejszają wartości pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Uważam, że podjęte w niej badania są niezmiernie aktualne i nowatorskie. Zostały znakomicie zaplanowane i bardzo rzetelnie wykonane. Wyniki zostały przedstawione szczegółowo i czytelnie, a wnioski z nich wypływające, zamieszczone przez Doktorantkę w 5 punktach są logiczne. Istotnym osiągnięciem Autorki jest opracowanie i zwalidowanie metod oznaczania wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz wykazanie, że elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej może być stosowana jako metoda przesiewowa do badania wiązania substancji o różnych właściwościach fizykochemicznych. Wymagało to od Doktorantki bardzo dużego nakładu pracy połączonego z odpowiednią starannością i dokładnością, a przede wszystkim dużej wiedzy w celu uzyskania wyników analitycznych o jak największej jakości. Niewątpliwymi osiągnieciami Autorki jest też wykazanie, iż elektroforezę kapilarą i dializę równowagową (uważaną dotychczas jako standard w badaniach wiązania leków z białkami krwi) można uznać za techniki równocenne. Przewagą elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej jest jednak możliwość bezpośredniego pomiaru stężenia wolnej frakcji leku, co istotnie obniża koszt i czas analizy. Ponadto, z uwagi na możliwość wykonywania analiz w różnych temperaturach elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej może być stosowana do oceny termodynamiki w procesie wiązania związków z białkami krwi. Uzyskane wyniki badań są nie tylko bardzo rzetelne, ale także niezwykle interesujące pod względem poznawczym oraz posiadają duża wartość praktyczną (kliniczną).

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autorki. Powierzona mi do oceny praca spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawom doktorskim. Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum UJ wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Gonciarz-Dytman do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 07.02.2018

Jacek Wójcikowski

dr hab. Jacek Wójcikowski