

Posudek habilitační práce

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.: Využití elektroanalytických metod a jejich kombinace s chromatografií a hmotnostní spektrometrií ke studiu oxidačně-redukčních přeměn xenobiotik.

Celkově je předložená práce rozdělena na souhrn předkládaných poznatků a na soubor kopií 10 publikací v rámci příloh.

Zmíněný souhrn pak zahrnuje nejprve informace o využitých teoretických i metodických principech ve vztahu ke studiu chování diskutovaných látek a posléze konkrétní získané výsledky a poznatky týkající se těchto látek. Předmětem studia byla vybraná xenobiotika, jejich metabolity, řešení parametrů redox-reakcí, jejich kinetiky, mechanismů, modelových nebo reálných souvislostí s procesy v živých organizmech, s toxickými nebo léčivými účinky apod.

Předmětem zájmu byla v té souvislosti vybraná xenobiotika, která jsou z živých organismů obvykle vylučována přeměnou na polárnější molekuly, za účasti konjugace s glukuronovou kyselinou, s glutathionem a s uplatněním sulfátování, acetylování, methylování atp. Jejich metabolické přeměny jsou katalyzovány enzymy, přičemž zde v první fázi hlavní roli hraje systém cytochromu P450 (CYP) katalyzujícího zejm. oxidační procesy, hydroxylaci, nebo též dealkylaci, deaminaci, dehalogenaci, desulfataci, peroxidaci atd. Někdy je přítom toxicita metabolitu vyšší než toxicita samotného xenobiotika (např. paracetamol je metabolizován na hepatotoxický N-acetyl-p-benzochinon). Při studiu chování zmíněných látek se využívá jak měření „in vivo“ nebo „in vitro“, tak i neenzymatických biomimetických systémů, obsahujících např. metaloporfyriny nebo Fentonovy reagenty (Fe^{2+} , H_2O_2 , HO^\bullet , ...).

Elektrochemie umožňuje studovat v komplexu i odděleně oxidační i redukční procesy, podle potřeby i v kombinaci s protolýzou, adsorpcí, komplexací, s návaznými redox-proměnami, s izolací produktů atd. Zvolená xenobiotiky přitom obsahují oxidovatelné skupiny, jako fenolovou, benzodioxolovou, terciální aminoskupinu apod.

Kombinace elektrochemie s kapalinovou nebo plynovou chromatografií (LC/GC), s hmotnostní spektrometrií (MS) a s dalšími sofistikovanými technikami dokumentuje nejen autorčin široký odborný záběr, ale především její velmi kvalitní přístup k vědeckému zkoumání, které popsala. K tomu je třeba přičíst fakt, že autorka promítala osobní zkušenosti i do volby přílehlavých variant zmíněných metod s cílem získávání detailnějších informací a jejich vzájemného porovnávání u sledovaných látek. Tak například v případě rotační diskové uhlíkové elektrody využívala u stejnosměrné (DC) nebo cyklické voltametrie (CV) měření za různé rychlosti scanu v , různé úhlové frekvence ω rotace C-elektrody apod. Vedle diskuse o potenciálech redox-přeměn ($E_{1/2}$), o difúzních koeficientech D a počtu vyměňovaných elektronů z mohla např. též usuzovat na charakter řídicích procesů (difúze, kinetika dějů, adsorpce apod.) a na změny vyvolané změnami hodnot pH. Ze změn $E_{1/2}$ s pH odhadovala hodnoty pK. Uvažovala podobnosti mezi redox potenciály E_{redox} týkajícími se dějů na elektrodách v porovnání s obdobnými veličinami při kontaktu látky s aktivním hemovým redox-centrem FeO^{3+} působícím jako anoda vůči látce (substrátu) se snadno oxidovatelným heteroatomem N, S, P aj. nebo nenasyčenou vazbou.

Při studiu elektrochemických mechanismů, kdy docházelo ke kombinaci elektrochemických kroků s kroky chemickými (jako ECE nebo jiné mechanismy), s dimerací na povrchu elektrody (EC_2) aj., byly pro identifikaci dimerních nebo oligomerních produktů (např. u bromfenolů) využity též GC/MS a HPLC/MS-metody s nahromadění produktů na povrchu elektrody (ASAP sondy) při různých potenciálech E . Koeficienty přenosu náboje α byly vyhodnocovány pomocí vztahů podle Nicholson-Shaina a též Randles-Ševčíkovy rovnice; u antimuskarinových léčiv a zejména zopiklonu a alkaloidu berberinu bylo využito i jejich hydrofobní interakce až silné adsorpce na povrchu C-elektrody,

umožňující i jejich přenášení z roztoku do jiného roztoku. Pro určení počtu vyměňovaných elektronů posloužila podle potřeby nejen DCV nebo diferenční pulzní voltametrie DPV, ale i coulometrie nebo semiintegrační voltametrie (SIV). Určení redox-aktivních center bylo též možné na základě modelování, a to pomocí strukturálních analog blízkých studovanému uskupení molekul nebo jejich částí. Tak tomu bylo např. u xanthohumolu obsahujícího 2 fenolové kruhy, poskytující CV signál podobně jako modelová kys. kumarová a floroglucinol. Platnost toho byla potvrzena elektrolýzou na velkoplošné Pt-síťce s následnou LC/MS analýzou („of-line“ nebo „on-line“) a podle potřeby i pomocí IČ či NMR. Avšak bylo též pozorováno, že elektrochemicky neaktivní prenylová skupina vykazovala metabolickou oxidaci katalyzovanou enzymy cytochromu P450.

Pro preparativní elektrolýzu před uplatněním LC/GC/MS byly využity elektrody na bázi Pt-síťky, spektrálního grafitu nebo vláknité uhlíkové štětičky CFBE. S podporou těkavých látek (elektrolytů) za ionizace elektrosprejem (ESI) nebo chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a případně i v kvadrupolovém uspořádání MS s analýzou doby letu (QqTOF) či s mikroextrakcí na vlákně v plynné fázi („head-space“ SPME) po tepelné desorpci analytů bylo dosaženo mimořádně cenných komplexních výsledků. Příkladem špičkových experimentálních výsledků byly „on-line“ EC/ESI-MA hmotnostní voltamogramy ve formě 3D-diagramů.

Popsaná metodická a instrumentální výbava byly výborným základem pro systematictější studium následujících příkladů xenobiotik:

1. Bromfenoly BP – obsažené ve vyráběných zpomalovačích hoření, v některých pesticidech, mezi metabolity mořských organismů aj. Jejich jednoelektronová oxidace vedla přes fenoxylvé radikály k tvorbě dienů s C-O-C nebo C-C vazbami (v závislosti na reakčních podmínkách) a tudíž i k elektropolymeraci až pasivaci elektrod. V kyselém prostředí dvouelektronová oxidace vedla přes fenoxoniové kationty k monomerním chinonům a dienům. Studium série 2 BP; 3 BP; 4 BP; 2,4,6 TBP a pentabromfenolu PBP vyústilo v návrh série produktů, elektrosyntetizovaných a analyzovaných ve vodně-alkoholickém prostředí, s využitím LC, GC, EC, ASAP/MS vč. CFBE.

2. Antimuskarinika (proti inkontinenci), konkrétně tolterodin (TOL), fesoterodin (FES) a 5-hydroxytolterodin (5-HMT) obsahovala 2 redox-centra (fenolový kruh a terciální aminoskupinu). Bylo zjištěno, že TOL po elektrolýze v kyselém prostředí poskytl 5-HMT, který byl též farmaceuticky významným metabolitem enzymatické oxidace TOL katalyzované CYP2D6. Při vyšším potenciálu běžela oxidace na aldehyd, přičemž nebyla pozorována jeho další oxidace na karboxylovou kyselinu. Alkalické prostředí podpořilo reaktivitu terc. aminoskupiny na iminiový iont, následovanou odštěpením produktů.

U FES byla jako hlavní metabolická reakce označena hydrolýza esterové vazby nespécifickými esterázami, vedoucí k aktivní 5-HMT. Kinetiku této hydrolýzy bylo možno sledovat voltametriky při nižších potenciálech, než je potenciál oxidace hydroxymethylvé skupiny FES. Dealkylace terciální aminoskupiny FES probíhala snáz v alkalickém prostředí.

3. Berberin – alkaloid pomáhající léčit některá chronická onemocnění, jako jsou některé rakoviny, deprese nebo hypertenze. Vykazuje velmi rychlý metabolismus katalyzovaný enzymy CYP. Jeho redox-studium s návaznou kombinací LC/MS potvrdilo vznik řady metabolitů se 4 spřaženými kruhy (A až D), s redox-aktivní strukturou A až s o-dimethoxyskupinami na D (demethylace jedné z nich je též produktem katalýzy CYP).

4. Zopiklon – zástupce „léků Z“ (hypnotik, spasmolytik aj.) poskytoval za účasti adsorpce složitý DPV-signál. AC/MS odhalily několik oxidačních produktů, vč. N-demetylovaného zopiklonu (ND-Z) jako hlavního metabolitu působení cytochromu P450. Na porézní C-elektrodě vznikalo dle EC/MS /v 1:1 V/V voda/acetónitril) při různých *E* různé spektrum produktů.

5. Fentanyl a jeho analoga – nové syntetické opioidy proti bolesti, anestetika, antidepressiva apod. Bohužel využívány též k „řezání“ drog (pozn.: fentanyl je 100krát účinnější než morfin), zejm. heroinu, kokainu a metamfetaminu, kdy roste počet úmrtí z předávkování. Přitom norfentanyl patří mezi hlavní metabolity enzymatických reakcí fentanylu katalyzovaných cytochromem P450. V rámci předložené práce byla studována možnost likvidace fentanylu z vodných roztoků pomocí Fentonovy reakce (přes radikály HO^\bullet , HO_2^\bullet apod.) v porovnání s jinými oxidačními činidly, např. kys. peroctovou aj.

Jak z výše uvedeného i z přiložených publikací v kvalitních časopisech vyplývá, je posuzovaná práce co do jejího odborného obsahu velmi obsažná. Je přitom zpracována pečlivě přehledně a pro čtenáře zcela srozumitelně. To vše dokumentuje jak vysokou odbornou, tak i pedagogickou vyzrálост autorky, jakož i šíři jejích znalostí a nabytých zkušeností. Nepřekvapuje proto ani to, že patří mezi uznávané účastníky a přednášející i na mezinárodních konferencích, kde je možné v roli posluchače ocenit i její „lahodnou“ angličtinu, kterou sdělované poznatky popisuje. Velké uznání si přitom zaslouží i její empatické vystupování vůči okolí, skromnost a lidský přístup. Kombinace zmíněných atributů způsobila, že se autorka předložené práce již ve svém oboru stala nepřehlédnutelnou a současně uznávanou osobností akademické komunity.

K posuzované práci mám spíše do diskuze následující dotazy, které však nijak kvalitu habilitační práce nesnižují:

1. Při posuzování míry irreverzibility systémů nebo vlivu pH apod. pomocí cyklické voltametrie CV se zejména pro rychlou orientaci vychází z posuvu polohy píku E_p vůči poloze odpovídajícího reverzibilního píku na potenciálové ose. V případě posuvů E_p např. řádově ve stovkách mV je tento přístup vyhovující (viz např. obr. 2, str. 14). V případě menších posuvů E_p by bylo z hlediska teorie exaktnější vycházet nikoliv z posuvu E_p , ale ze změny polohy jiného charakteristického bodu na voltametrické křivce.

2. Využila autorka štětičkovou uhlíkovou elektrodu za podmínek běžné voltametrie v nádobce? Jak se vypořádávala s případnou pasivací jejího povrchu? Jaká byla opakovatelnost výsledků, i vzhledem k tomu, že část elektrody fungovala patrně jako „array“ mikroelektrod a část jako kompaktní C-elektroda?

3. Za potenciostatických podmínek využívala autorka elektrody s plochou řádově jednotek i desítek cm^2 ? Stačily jí k tomu i poměrně běžné „analytické“ potenciostaty, nebo bylo třeba použít výkonnější?

4. Jaké maximální pozitivní potenciály bylo možné využít pro oxidaci 5-HMT na daných elektrodách?

5. Domnívá se autorka na základě získaných zkušeností, že by bylo možné ještě zvýšit účinnost Fentonovy reakce pro degradaci fentanylu ve vodách? A jaká je reálná naděje na využitelné operativní stanovení fentanylu v heroinu a jiných v práci zmíněných drogách?

Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem doporučuji habilitační práci RNDr. Jany Skopalové, Ph.D. k obhajobě, na základě níž by jí mohl být udělen titul „doc.“ (docent).

V Praze dne 1. 2. 2024

prof. Dr. Ing. Ladislav Novotný, DrSc.
oponent