

**Oponentský posudek disertační práce Mgr. Přemysla Císaře:  
Bioanalytické metodické přístupy při sledování osudu nového potenciálního léčiva  
v organismu pomocí HPLC-PDA-MS-MS.**

Předložená disertační práce má celkem 138 stran. Hlavními částmi z celkového rozsahu jsou 50 stran teoretické části, 23 stran experimentální části a výsledků, 45 stran tvoří kopie 4 prací v zahraničních odborných časopisech, z nichž každá je opatřena stručným komentářem.

Mgr. Císař je prvním autorem rozsáhlé publikace v časopise *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (IF 2,03, Císař P, Nobilis M, Vybíralová Z, Holčápek M, Kolářová L, Pour M, Kuneš J, Klimeš J.: „Disposition study of a new potential antineoplastic agent dimefluron in rats using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection“. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37(5):1059-71). Jedná se o bioanalytickou publikaci výjimečné kvality. Upozorňuji zejména na syntézu standardů metabolitů dimefluronu a vhodného vnitřního standardu doloženou NMR a hmotnostními spektry a na použití tandemového uspořádání sofistikovaných detekčních technik, které umožnilo identifikovat ve stolici potkana deset metabolitů dimefluronu.

Druhá práce publikovaná ve stejném časopise, se zabývá separací enantiomerů redukovaného benfluronu a dimefluronu. Zahrnuje testování velkého počtu chirálních kolon a výsledky analýzy těchto metabolitů ve vzorcích z inkubace obou mateřských látek v suspenzích jaterních mikrosomů několika zvířecích druhů a člověka. I tato práce má vysokou metodickou kvalitu. Mgr. Císař je spoluautorem práce.

Třetí práce, již je uchazeč spoluautorem, metodicky předchází první práci a je zaměřena na systematické srovnávání kvality separace léčiv včetně dimefluronu a jejich metabolitů na HPLC kolonách s různými stacionárními fázemi. Práce vyšla v časopise *Journal of Separation sciences* (IF 2,5).

Čtvrtá práce, již je uchazeč spoluautorem je zaměřena metodicky do zcela jiné oblasti bioanalytiky – jedná se o spektrofotometrické stanovení léčiva po jeho iontově-párové extrakci z multikomponentního přípravku s pevnou lékovou formou. Práce byla otištěna v časopise *Microchemica acta* s IF 1,2.

K uspořádání disertační práce a k jejímu obsahu mám následující připomínky a dotazy.

1/ Teoretická část je neúměrně rozsáhlá a má příliš široké zaměření. Za zbytečné považuji např. stručný přehled procesů ADME, výklad základních komponent HPLC systému, rozsáhlý popis principu měření na různých typech hmotnostních detektorů, popis různorodých technik přípravy vzorku před analýzou, které nebyly použity v disertační práci, metody kvantifikace analytu apod.

Naopak velmi zdařilé jsou pasáže týkající se metabolismu xenobiotik obecně, biotransformace benfluronu a odhadu biotransformace dimefluronu. Jelikož je disertační práce zaměřena především na metabolismus dimefluronu, je tato část skutečným teoretickým východiskem experimentální části a publikovaných prací.

**Otázka:** Jaká je celková koncentrace bílkoviny v krevní plazmě a v séru ? Str. 23 první odstavec diskutuje rozdíl mezi krevní plazmou a sérem z bioanalytického hlediska takto, citují: „ rozdíl obou typu vzorků z analytického hlediska je v zastoupení bílkovin, jichž sérum obsahuje výrazně méně“.

2/ Experimentální část by naopak bývala zasloužila rozšíření především o detailnější data z vývoje a validace bioanalytické metody. Výběr stacionární fáze a charakteristika separace je obsažena ve třetí publikaci. Příprava a ověření kvality standardů metabolitů jsou v první publikaci. Nicméně data z optimalizace extrakce a z další validace jsou prezentována nedostatečně.

Str. 77 popisuje extrakci dimefluronu a jeho metabolitů ze stolice a moče potkanů.

**Otázka:** jaká byla výtěžnost extrakce látek? Byla testována stabilita látek za podmínek odpovídajících podmínkám sběru stolice a moči v metabolických klecích?

Strany 78-81 Biotransformační studie.

**Otázka:** Nejsou mi jasné obrázky 30 a 31. Jedná se o časový profil exkrece dimefluronu a metabolitů ve stolici nebo v moči? Nebo se jedná o látkové množství ve stolici a moči dohromady?

Proč nebyla odděleně prezentována látková množství konjugátů a látková množství metabolitů 1. fáze (experiment s enzymy minus experiment bez enzymů) v obou druzích materiálu?

Podle publikace 1 jste v bilanční studii zjistili, že celkové množství dimefluronu plus metabolitů ve stolici sbírané 7 dnů po podání je 7.3% podané dávky. Parentní látka reprezentuje v tomto množství největší část.

**Otázka:** Může se jednat z části o nevstřebaný dimefluron? Jaká je bilance v moči?

Bilance ve stolici nepřímou ukazuje na vysokou absolutní biologickou dostupnost dimefluronu po perorálním podání.

**Otázka:** Máte již informace o koncentracích dimefluronu a metabolitů v plazmě? Bylo zkoumáno jiné než perorální podání?

### **Závěr a doporučení.**

Předložená disertační práce je velmi kvalitní. Mgr. Císař prokázal schopnost dobře teoreticky a prakticky zvládnout náročný výzkumný projekt a mnoho experimentální technik z oblasti bioanalytiky s ním spojených. Mgr. Císař je spoluautorem a prvním autorem 4 prací otištěných v zahraničních časopisech vysoké kvality s významným impakt faktorem a s odpovídající náročností recenzního řízení, které je zárukou kvality publikovaných prací.

**Proto doporučuji komisi pro obhajobu, aby přijala hodnocení „prospěl“ a udělila Mgr. Císařovi akademický titul Ph.D.**

V Hradci Králové, 5.1. 2008

Doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D.  
Ústav farmakologie, Ústav lékařské chemie  
Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové