



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika, <http://www.faf.cuni.cz>
tel. +420495067111, fax +420495518002

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Přemysla CÍSAŘE

**„Bioanalytické metody přístupu při sledování osudu nového potenciálního léčiva
v organismu pomocí HPLC-PDA-MS-MS“**

Předložená disertační práce Mgr. Přemysla Císaře představuje velmi zajímavý příspěvek autora a kolektivu spolupracovníků k řešení problematiky analýzy xenobiotik v biologickém systému. K analýze jsou využívány nejnovější poznatky z oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

Práce je členěna standardně, na konci jsou přiloženy kompletní publikované práce. Teoretická část je rozdělena na dva oddíly zabývající se bioanalytickými aspekty xenobiochemie a ADME studií a analytickou částí. Experimentální část je věnována biotransformaci dimefluronu, představitele 2. generace benzo[*c*]fluorenových antineoplastik. Předložené experimentální výsledky na potkanech jsou prvním, ale velmi významným, krokem k rozhodnutí, zda bude mít dimefluron očekávaný terapeutický potenciál, takže předložená disertační práce je jakousi pilotní prací, na kterou se bude zřejmě navazovat.

Autor ve své experimentální práci prezentuje nejen širokou škálu separačních metod, ale musel rovněž zvládnout velmi náročné techniky izolace parentní látky a příslušných metabolitů z biologického materiálu. K tomu musel zvládnout i základy xenobiochemie a naučit se orientovat v metabolismu léčiv.

Autorovi se podařilo nalézt vhodné chromatografické podmínky, které vedly k identifikaci a následné kvantifikaci 6-ti metabolitů I. fáze biotransformace a k charakterizaci 2 metabolitů II. fáze biotransformace.

Práce je středního rozsahu, doplněná hojným počtem obrázků (celkem 35). Cíle práce jsou v disertaci jasně formulovány a všechny byly úspěšně splněny. Předložená práce je velmi dobře zpracována, je značně multidisciplinární a může částečně sloužit i jako návod pro bioanalytické hodnocení některých dalších léčiv.

K práci nemám zásadní výhrady, mám jen následující připomínky a dotazy:

- 1) Práce je dobře sepsána, po formální stránce pouze s malým počtem chyb (např. kap.4.4.1, 3.řádek ...vzorky moče s odběrů z nejvyšším obsahem...nebo na str.84, 1.řádek – nepíše se **glukuronidasace** ale **glukuronidisace**). Trochu vadí nejednotnost v odkazech na literaturu – někdy na konci věty, jindy až za větou,

výrazy typu „*in vitro*, *in vivo*“ by měly být rovněž jednotné v celé práci – na str. 12 nalezneme „*in-vitro*, *in-vivo*“, v kapitole 4.4 je samci č.3 podána dávka 67,6 mg, nikoliv g DMF.

- 2) Popisky k obrázkům spolu s případnou legendou se standardně píší pod obrázky.
- 3) V kap.3.1.2 píšete, že ve II.fázi biotransformace dochází ke konjugaci metabolitů s endogenními látkami jakou je např **kyselina sírová**. Ta endogenní látkou není, donorem sulfátu je pouze **3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát**.
- 4) Trochu nepřehledná a neúplná se mi zdá kapitola 3.1.2.1, která popisuje I.fázi biotransformace. Chápu, že práce není sepsána s hlavním důrazem na xenobiochemii, ale není mi jasné, proč jsou např. u **CYP450** některé reakce popisovány podrobně a jiné zcela chybí. Spíše bych se přikláněl k úplnému výčtu katalyzovaných reakcí bez jejich dalších podrobností. Dále předpokládám, že ...**oxidace ketonů**... je překlep a autor myslel **redukci ketonů**. Informace v kapitole 3.1.2.1.2 **Redukce xenobiotik** je dosti zastaralá a neodpovídá současným znalostem o této skupině enzymů.
- 5) Obr. 32 a 33 spolu nekorespondují – proč? U obou jsou takřka shodné retenční časy parentní látky a metabolitů I.fáze biotransformace, ale zásadně se liší R_t metabolitů II.fáze biotransformace (**4,075 min a 5,1 min** pro redukovaný; **6,708 min a 5,9 min** pro 7-oxo metabolit).
- 6) Dimefluron byl potkanům podáván jako roztok nebo suspenze?
- 7) Jaký byl výtěžek (DMF + všechny metabolity) po podání cca 70 mg DMF – alespoň odhad?
- 8) Proč se jako IS pro kvantifikaci polárnějších metabolitů používal homo-DMF, který je ještě méně polární než DMF?

Závěr

Po celkovém zhodnocení předložené disertační práce Mgr. Přemysla Císaře mohu plně doporučit, aby byla práce přijata k obhajobě a dalšímu řízení. Doporučuji rovněž, aby byl Mgr. Přemyslu Císařovi po úspěšné obhajobě přiznán vědecký titul **Ph.D.**

V Hradci Králové, 4.1.2008



Doc. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.
Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biochemických věd