

Téma diplomové práce	Studium chirálních aspektů biotransformace léčiv instrumentálními analytickými metodami
Jméno studenta, studentky	Bc. Veronika Holmanová
Jméno oponenta	PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D

II. Posudek oponenta

Bc. Veronika Holmanová se ve své diplomové práci zabývala optimalizací chromatografických podmínek pro chirální separaci nesteroidního antiflogistika nabumetonu a jeho metabolitů a následným využitím této metody pro studium biotransformace léčiva *in vitro*.

Práce je sepsána na 53 stranách, je členěna obvyklým způsobem a obsahuje 34 odkazů na literární zdroje. Na konci práce jsou umístěny 4 přílohy obsahující některá experimentální data.

V teoretické části se autorka nejprve zabývá chiralitou a popisuje základní principy chiroptických metod, v závěru této části je umístěna stručná kapitola o analyzovaném léčivu - nabumetonu. V experimentální části byly nejprve optimalizovány chromatografické podmínky pro separaci nabumetonu a jeho pěti metabolitů, s důrazem na separaci dvou enantiomerů redukovaného a dvou enantiomerů O-desmethylovaného léčiva. Poté byla ověřena linearita vyvinuté metody. Byly provedeny *in vitro* inkubace nabumetonu i jeho metabolitů s mikrosomální a cytosolickou jaterní frakcí (potkaní, lidskou) a vzorky z těchto inkubací byly analyzovány. Hlavní pozornost byla věnována studiu metabolické aktivity a stereospecifity enzymů, které se účastní metabolismu nabumetonu.

Práce obsahuje poměrně velké množství dat a svědčí o velkém množství experimentální práce, kterou diplomantka vykonala.

Teoretická část práce je zpracována jasně a přehledně. Poněkud horší orientace ve výsledcích (především v části týkající se *in vitro* experimentů) je způsobena tím, že obrázky dokumentující výsledky nejsou v textu vždy uvedeny v pořadí, ve kterém jsou citovány (např. obr. 23, 24 je v textu diskutován dříve než obr. 19,20). Část chromatografických záznamů a tabulek s výsledky je uvedena v části „Výsledky a diskuze“, avšak další chromatogramy a tabulky jsou přiloženy formou příloh. Na obrázky přílohy 4 však v textu chybí příslušné odkazy. Některé chromatogramy jsou pak uvedeny v obou částech. Není zcela jasné, proč autorka nezařadila do přílohy také chromatogramy vzorků po inkubaci 6-MNA, přičemž záznamy vzorků inkubací všech ostatních metabolitů jsou v příloze uvedeny. Část „Výsledky a diskuze“ končí Tab. 5, která není v textu citována a není k ní ani uveden žádný komentář. Vyjádření retenčních časů na 3 des. místa společně s umístěním názvu píku přímo do chrom. záznamu také poněkud zhoršuje orientaci v obrázcích, zvláště pak při znázornění separace většího množství látek (např. obr. 25,26).

Z formálních výhrad bych ještě zmínila poměrně velké množství anglických termínů v textu (např. long term nebo freeze-thaw stabilita, pro-drug atd.). Jednotky koncentrace by měly být v celé práci uváděny minimálně jednotně (v některých případech je používáno označení „M“ jindy „mol/l“). Odkazy na literaturu v textu nemají jednotnou formu.

Dále mám k práci následující připomínky a dotazy:

- Str. 16. V nadpisu uvádíte bez vysvětlení zkratky CD a ORD. Co tyto zkratky znamenají?
- Str. 20. Obr. 9: Jaký je správný popis obrázku?
- Str. 21: Jaký je správný chemický název nabumetonu?
- Str. 21: Uvádíte, že se nabumeton biotransformuje v játrech na hlavní účinnou molekulu 6-methoxy-2-naftyloctvou kyselinu a další biologicky neaktivní metabolity. V práci se pak zabýváte především karbonyl redukovanými metabolity. Dá se předpokládat, že by tyto metabolity mohly mít význam pro terapii nebo toxikologický profil léčiva nebo jde spíše o vhodný modelový případ pro studium stereospecifity biotransformačních enzymů?

- Str. 25: S jakou přesností jste měřila pH mobilní fáze, opravdu na 2 des. místa?
- Str. 29: Biologické slepé vzorky: Neměly by tyto vzorky obsahovat kromě zmíněných složek (DMSO, fosfátový pufr a mikrosomy) také NADPH?
- Jaký je český ekvivalent k pojmům: „long term“ a „freeze-thaw“ stabilita?
- Str. 36: Kalibrační křivka: Využili jste regresní rovnici procházející nulou, ověřovali jste experimentálně, že přímka opravdu nulou prochází?
- Str. 40: Uvádíte, že jste provedli MS analýzu neznámého metabolitu, který vznikl při inkubaci a eluoval se kolem 26. min. Získali jste na základě těchto analýz představu o jeho struktuře?
- Str. 40: V textu píšete, že jste provedli „drug metabolism tracing“, můžete tento termín vysvětlit?
- Vysvětlíte pojem „enantiomerní excess“, který používáte v textu.

Uvedené připomínky nesnižují kvalitu předložené práce, a proto ji doporučuji k obhajobě.