

## Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Yogeeta Nautamlal Babú

### „Phase II biotransformation of NSAID flobufen“

Mgr. Yogeeta Nautamlal Babú se ve své disertační práci zabývala xenobiochemickými experimenty s nesteroidním antiflogistikem flobufenem, jejichž cílem bylo odhalení způsobu 1. a zejména pak 2. fáze biotransformace tohoto léčiva na různých hierarchických úrovních : subcelulární (potkaní mikrosómy), buněčné (morčecí a lidské hepatocyty) i v celém organismu (morče). Flobufen je chirální (má 1 stereogenní centrum) a současně prochirální léčivo (po redukci karbonylu vzniká druhé stereogenní centrum), v HPLC analýze tudíž musela být použita chromatografická kolona s chirálním selektorem. Protože struktura metabolitů 1. a zejména 2. fáze biotransformace nebyla známa, musela být využita hyphenální analytická technika HPLC-MS/MS k identifikaci chemických struktur a ke stanovení metabolitů flobufenu.

Disertace má rozsah 125 stran, dalších 18 stran textu tvoří příloha obsahující čtyři publikace, na kterých se Mgr. Babú podílela jako první autorka nebo spoluautorka. Dizertační práce je sepsána v anglickém jazyce, doplněná českým abstraktem, formálně je členěna způsobem obvyklým pro tento typ kvalifikační práce.

V teoretické části autorka nastínila přehled enzymů podílejících se na katalýze přeměn xenobiotik v 1. a 2. fázi biotransformace, přehled typů biotransformačních reakcí xenobiotik včetně chirálních aspektů přeměn, přehled metod, které se ke studiu biotransformace léčiv využívají. Zvláštní kapitoly jsou věnovány přípravě vzorku, LC-MS a NSAIDs, jejichž jeden representant byl studován v této dizertaci.

Autorce dizertace se xenobiochemickými experimenty s analytickou podporou chirální LC-MS/MS podařilo identifikovat acyl glukuronid flobufenu, acyl glukuronid M17203 a konjugát M17203 s taurinem. Byly nalezeny rozdíly v enzymové kinetice enantiomerů flobufenu.

V předložené disertační práci jsem nenalezl závažnější formální nebo obsahové nedostatky, drobné nedostatky zmíněné dále nikterak nesnižují kvalitu tohoto vědeckého pojednání.

Autorka se během své postgraduální výchovy zúčastnila několika tuzemských i mezinárodních konferencí, na kterých prezentovala dílčí výsledky své experimentální práce. Finálním výsledkem postgraduální výchovy bylo sepsání čtyř publikací o biotransformaci

flobufenu, které byly zveřejněny v prestižních impaktovaných zahraničních periodících. Mgr. Babú je hlavním autorem na práci zveřejněné v analytickém časopise Talanta, spoluautorem je na člancích zveřejněných v časopise BMC Pharmacology (1 práce) a Chirality (2 práce).

#### **Závěr :**

Předložená disertační práce Mgr. Yogeety Nautamlal Babú splňuje po stránce obsahové i formální všechny požadované náležitosti. Během své postgraduální výchovy se dizertantka seznámila velmi detailně s teorií i metodologií xenobiochemických experimentů, jejichž cílem bylo studium biotransformačních přeměn flobufenu v podmínkách *in vivo* a *in vitro*. K analýze metabolitů flobufenu v různých biomatricích sloužila vysoceúčinná kapalinová chromatografie v tandemovém spojení s hmotnostní spektrometrií, kterou byly identifikovány separované struktury metabolitů 2. fáze biotransformace nesteroidního antiflogistika flobufenu. Výsledky této disertační práce Mgr. Babú jsou cenným příspěvkem k poznání osudu zmíněného NSAID v organismu.

Doporučuji proto, aby disertační práce Mgr. Yogeety Nautamlal Babú byla přijata k obhajobě a stala se podkladem k udělení vědecké hodnosti PhD.

#### **Připomínky, dotazy a náměty do diskuse :**

Str. ii: „Doc. Wsól...Doc. Skálová...Doc. Szotáková...“ Podle <http://en.wikipedia.org/wiki/Docent> „In American English (but not in British English, where the word is not used), a **docent** has two meanings. Firstly, a professor or university lecturer; and secondly, the corps of volunteer guides who staff museums and other educational institutions. Docent is derived from the present participle (docens, docentis) of the Latin word *docēre*, meaning "to teach". Doporučuji používat **Associate Professor**.

Str.7... doporučuji **dimethyl sulfoxide** na místo **dimethylsulphoxide**

Str.51... v třídění NSAIDs postrádám skupinu neutrálního proléčiva **nabumetonu**, které se v organismu biotransformačně aktivuje na účinnou 6-methoxy-2-naftyloctovou kyselinu

Str.88 a 95...Opravte si dvojbazný dusík ve struktuře taurinového konjugátu M17203 !!!

Dotaz ke struktuře flobufenu a jeho *phase I* biotransformaci: Atomy fluoru jsou zaváděny do aromatické části molekuly léčiva Balz-Schiemannovou reakcí (převedení arendiazonium chloridu na málo rozpustný arendiazoniumtetrafluoroborát, který se nechá vychnout a poté se tepelně rozloží na fluorovaný aren). Ve farmaceutické chemii se učí, že pozice aromátu, které jsou obsazeny fluorem, podléhají méně ochotně nebo vůbec nepodléhají arenoxidaci. Přesto

byly popsány arenoxidace fluorovaných arenů doprovázené dokonce NIH přesmykem fluoru na sousední uhlík. Mezi metabolity flobufenu 1. fáze biotransformace by se tedy prakticky neměly vyskytovat arylhydroxy metabolity a z metabolitů 2. fáze biotransformace by prakticky neměly být zastoupeny ether glukuronidy. Je tomu tak, nebo byly pomocí LC-MS nalezeny alespoň stopy arylhydroxy flobufenových metabolitů a jejich ether glukuronidů?

Jaký je mechanismus tvorby M17203, který vzniká z flobufenu ztrátou 3 uhlíků? V jaké formě se tyto tři uhlíky odštěpují? Jde o oxidační nebo redukční reakci? Je známo něco o enzymologii této reakce?

Byly prováděny experimenty s  $\beta$ -glukuronidasou a arylsulfatasou ? Jejich inkubace s biomatricí by napověděla mnohé o struktuře metabolitů 2. fáze biotransformace flobufenu.

Ke straně 107. Překvapuje absence acylglukuronidu flobufenu v moči. Kudy se tedy vlastně acyl glukuronid, jehož tvorba byla v potkaních mikrosomech prokázána, vylučuje???



Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

Ústav experimentální biofarmacie

Heyrovského 1207

500 03 Hradec Králové

Květen 2008

