

Ing. Miroslav Kuchař, DrSc.,  
Zentiva, a.s.  
U kabelovny 130,  
102 37 Praha 10

**Oponentní posudek**  
na disertační práci (PhD.) Mgr. Yogeety Nautamlal Babú na téma:

*Phase II Biotransformation of NSAID Flobufen*

Jak již název disertace napovídá, je předložená práce věnována biotransformaci flobufenu, který byl začátkem devadesátých let vyvinut v tehdejší Východní ústavu pro farmacii a biochemii a klinicky se osvědčil v léčbě reumatoidní artritidy. Předložená práce je součástí studia metabolismu tohoto antireumatika, kterému byla věnována značná pozornost na katedře biochemie farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

Ke kladům předložené práce patří jasná formulace cílů práce, tj. především popsat II. fázi biotransformace flobufenu a jeho metabolitů v systémech *in vitro* a *in vivo* a po případě charakterizovat enantioselektivitu konjugačních reakcí flobufenu. Tím vytvořila logický rámec pro svoji experimentální práci, což považuji za velmi důležitý a pozitivní rys každé vědecké práce.

V úvodu autorka věnuje značnou pozornost popisu biotransformačních reakcí a jejich stereochemickému průběhu. Rovněž jsou podrobně popsány základy použité separační a identifikační metodiky. Tyto části úvodu mají mnohdy spíše edukativní charakter a jejich vztah k vlastní práci je poněkud vzdálený. Bohužel, podstatně méně pozornosti věnovala autorka rešerši látky, která je tématem předložené práce (toto téma bude zmíněno v připomínkách k předložené práci). Při výkladu pojmů souvisejících s chiralitou poněkud překvapivě není zmíněn termín diastereoisomérních dvojic – pro lidský metabolit flobufenu zvláště významný, neboť umožňuje, vzhledem k rozdílným fyzikálně chemickým vlastnostem, jejich dělení v achirálním prostředí. V závěru úvodu se autorka pokusila o rozdělení nesteroidních protizánětlivých léčiv a lze konstatovat, že se jedná o pokus vcelku úspěšný. Nicméně jistý problém představují heterocyklické alkanové kyseliny: jednak tolmetin nepatří mezi indolové deriváty – jedná se o derivát pyrrolový; jednak existuje celá řada dalších heterocyklických derivátů alkanových kyselin – jako jsou zomepirac (pyrrol), lonazolac a isofezolac (pyrazol), tiaprofen (thiofen) nebo oxaprozin (oxazol).

Pro separaci metabolitů a jejich identifikaci zvolila autorka obvyklé, nicméně adekvátní metody, tj. kapalinovou chromatografii a hmotovou spektroskopii. Separovala

glukuronidy flobufenu (včetně enantiomerů) a jeho hlavního metabolitu u potkana, tj. kyseliny 2',4'-difluorbifenyl-4-yloctové (VÚFB 17203) a popsala jejich strukturu. Značnou pozornost věnovala přiřazení vhodného kinetického modelu glukuronidace racemického flobufenu a jeho obou enantiomerů. Zjištění enantioselektivity tohoto procesu a přiřazení modelu Michaelis-Mentenové (S)-enantiomeru a kombinovaného empirického modelu (R)-enantiomeru patří k důležitým výsledkům předložené práce. Součástí práce je rovněž separace konjugátu hlavního metabolitu s taurinem a jeho charakterizace hmotovou spektroskopií. I v tomto případě byla studována kinetika procesu a přiřazen model Michaelis-Mentenové.

Autorka výsledky své práce v rámci doktorandského studia publikovala ve čtyřech sděleních v zahraničních časopisech; na jednom jako první autor, na ostatních jako spoluautorka. Tyto výsledky prezentovala rovněž na řadě zahraničních i tuzemských konferencích.

K předložené práci mám několik drobných připomínek a dotazů:

K rešerši o flobufenu (str. 53 – 56) - v souvislosti s hlavním metabolitem u potkana, tj. kyselinou 2',4'-difluorbifenyl-4-yloctovou kyselinou není jasné proč není zmíněna práce R. Lapky a spol. (1990), věnovaná farmakokinetice flobufenu a jeho hlavního metabolitu u potkana, který zde byl identifikován. Tento fakt je znovu zmíněn v práci V. Panajotové a spol. (1996) zabývající se farmakologickým hodnocením flobufenu. V této práci je rovněž zmíněn účinek flobufenu na cytokiny – je možno ji tedy použít místo anonymní citace na str. 54. V souvislosti se stereochemií flobufenu a jeho hlavního metabolitu u člověka by asi neměla chybět citace práce (Kuchař a spol., 1997) zabývající se syntézou, stanovením absolutní konfigurace, hodnocením optické čistoty a biologickým hodnocením enantiomerů flobufenu a všech čtyř chirálních forem metabolitu. V lidské plasmě byl identifikován jako lakton 4-(2',4'-difluorbifenyl-4-yl)-4-hydroxy-2-methylbutanové kyseliny. Rovněž byla již popsána enantioseparace flobufenu, a to na koloně Chirobiotic E Tesařovou a spol. (1997)

Lapka R., Šmolík S., Rejholec V.: *Drug Metabol. Disp.* 18, 1060-1064.

Panajotová V., Anděrová E., Jandera A., Kuchař M.: *Arzneim.-Forsch.* 47, 648-652.

Kuchař M., Vosátka V., Poppová M., Knězová E., Panajotová V., Tomková H., Taimr J.: *Coll. Czech. Chem. Commun.* 60, 1026-1033.

Tesařová E., Gilar M., Jegorov A., Uhrová M., Deyl: *Biomed. Chromatogr.* 11, 321-324.

Str. 83 – Při studiu glukuronidace primárních metabolitů flobufenu nebyly zjištěny produkty glukuronidace hlavního lidského metabolitu. Ověřili jste v jaké struktuře je tento metabolit přítomen? Pokud se vyskytuje ve formě laktonu je zřejmé, že obě jeho funkční skupiny schopné interakce s glukuronovou kyselinou jsou intramolekulárně zablokovány. Tato

skutečnost není v práci jasně akceptována. Bohužel, na str. 54 nejsou strukturní vzorce metabolitů uvedeny.

Str. 85 – Domnívám se, že kinetický model pro racemický flobufen má do jisté míry virtuální charakter; glukuronidace každého z enantiomérů probíhá samostatně a v každém okamžiku je celková koncentrace glukuronidu součtem koncentrací glukuronidů jednotlivých enantiomérů. Odpovídají tyto vypočtené hodnoty zmíněnému modelu Michaelis-Mentonové?

Přes tyto drobné připomínky závěrem mohu konstatovat, že autorka ve své disertaci splnila všechny dílčí cíle, které na počátku deklarovala. Konstatuji tedy, že předložená disertační práce Mgr. Yogeety Nautamlal Babú představuje obsahově konsistentní vědeckou práci, v níž autorka prokázala schopnost vědeckého bádání. Práce splňuje všechny náležitosti doktorské (PhD) disertační práce, a proto doporučuji, aby byla přijata k obhajobě jako podklad pro udělení vědecké hodnosti PhD.

V Praze 16. června 2008



Miroslav Kuchař

