
Oponentský posudek diplomové práce

Název práce: **Identifikace a lokalizace vybraných léčiv a jejich metabolitů v potkaních tkáních s využitím hmotnostní spektrometrie**

Diplomant: **Bc. Martin Dušek**
Oponent: **Ing. Miloš Hroch, Ph.D.**

Těžištěm předložené práce experimentálního charakteru je identifikace, stanovení a prostorová distribuce tramadolu a jeho metabolitů v tkáních potkana. Okrajově se práce zabývá výběrem vhodných matic pro MALDI analýzu ursodeoxycholové kyseliny. Diplomant při práci využíval pokročilé postupy s využitím UHPLC-MS/MS a hmotnostně spektrometrického zobrazování MALDI-MSI. Uvedené techniky, využití při zpracování tématu diplomové práce vyžadují od diplomanta nadstandardní teoretické i praktické znalosti, pečlivou práci a v neposlední řadě i jistý přesah znalostí do medicínských oborů vzhledem k tomu, že se jedná o multioborové téma.

Předkládaná práce o rozsahu 115 stran má obvyklou formu a obsahuje veškeré náležitosti běžné pro tento typ dokumentu. Teoretická část, která je přehledně a obsáhle zpracována popisuje problematiku základních biotransformačních pochodů v živočišném organismu a dále pak techniky hmotnostní spektrometrie využívané při analýze léčiv a jejich metabolitů. Vhodně volené citace podporují dobrou úroveň práce a případnému zájemci dávají možnost hlubšího vhledu do řešené problematiky. Experimentální část popisuje optimalizaci chromatografické separace tramadolu a jeho metabolitů pro UHPLC-MS/MS stanovení, optimalizaci použitých matic pro MALDI-MSI a přípravu vzorků pro hmotnostně spektrometrické zobrazování.

K předkládané diplomové práci mám následující dotazy a připomínky, které jsem pro přehlednost rozdělil do několika skupin.

Dotazy a náměty do diskuze:

1A. Lze generalizovat tvrzení že hmotnostní spektrometrie je extrémně citlivá detekční technika?

2A. Je zde nějaký zvláštní důvod, proč byl pro testování ve tkáních zvolen právě tramadol a jeho metabolity?

3A. V dnešní době je dostupné velké množství homogenizačních technik a postupů (ultrazvuk, rozetření pod tekutým dusíkem, Ultra-Turrax, MagNA Lyser, apod. ...), přičemž použití různých technik může mít zcela zásadní vliv na kvalitu homogenizace daného materiálu a tím i vliv na stanovované koncentrace. Jakým způsobem byla tkáň homogenizována v případě jater a mozku?

Majoritní připomínky

1B. V práci je na mnoha místech v souvislosti s biotransformačními reakcemi II fáze používán termín sulfonace. Tento termín je běžný v anglickém jazyce (sulfonation), nicméně v češtině je preferovaným výrazem v uvedené souvislosti termín sulfatace. Na metabolit lze pohlížet jako na ester kyseliny sírové.

2B. Disociační konstanta tramadolu je 9.41, nikoliv 6.6 jak je uvedeno v práci. Trvá diplomant opravdu na tvrzení, že při $\text{pH} = \text{pKa}$ dochází k maximálnímu potlačení ionizace látky?

3B. Na základě popisovaného stanovení nelze tvrdit, že tramadol v moči nebo trusu nebyl přítomen. Správně by mělo být uvedeno, že koncentrace byla nižší než mez stanovitelnosti uvedené metody, která se po ověření často klade jako koncentrace nejnižšího kalibračního bodu.

Minoritní připomínky

Celkově velmi dobrý dojem z předložené práce poněkud snižují některé stylistické chyby, použití ne zcela vhodných termínů nebo některé překlady. Jen namátkou:

1C. Strana 11. Pro zvýšení polarizace molekuly biotransformační reakcí je použit termín „polarizace“, který však v odborné literatuře spíše odkazuje na změnu dipólového momentu vazby nebo molekuly. V uvedeném kontextu by bylo vhodnější použít termín „zvýšení polarity“.

2C. Strana 15. V odstavci popisujícím CYP2A6 je použito několika nevhodných formulací. V druhé větě tohoto odstavce vypadlo slovo „aktivita“, protože „kumarin je využíván jako marker aktivity“ nikoliv jako „marker enzymu“. Místo vyjádření „CYP enzym může být klinicky zesílen“ by bylo větu vhodnější formulovat např. jako: „Aktivita enzymu může být indukována“.

3C. Strana 46. V textu je uveden termín „silné a slabé napětí“. Vzhledem k tomu, že se termínem napětí odkazujeme k potenciálu, který je nízký nebo vysoký je použití v práci uvedeného sousloví nevhodné. Mělo by být použito termínu „nízké nebo vysoké napětí“.

4C. Strana 59. Běžně používaný termín v oblasti zpracování signálů je „vyhlazení signálu“ nikoli „uhlazení signálu“ jak je uvedeno v práci.

5C. Strana 61. Při odstředování je vhodné urychlení aplikované na vzorek vyjadřovat pomocí RCF (Relative Centrifugal Force) a nikoliv v otáčkách za minutu. Důvodem je snadná přenositelnost RCF mezi centrifugami různých konstrukcí, na rozdíl od otáček/minutu, kde potřebujeme znát navíc i průměr rotoru, abychom byli schopni vzorek vystavit stejné odstředivé síle na zařízení jiného výrobce.

6C. V práci postrádám vysvětlení některých zkratk, které nebyly rozepsány ani v textu ani v seznamu zkratk. Namátkou např.: strana 35 – DIOS, strana 52 – OTC, ITO

7C. Překlepy v názvech léčiv a některých termínech:

Strana 15 – Místo klopidogrel uvedeno klobidogrel, místo ticlopidin uvedeno triclopidin

Strana 58 – Místo femtomoly uvedeny fentomoly

Strana 95 – Místo flavinmononukleotid uvedeno flavimononukleotid

Strana 96 – Místo lineární uvedeno lienární

Závěr a doporučení

Předložená diplomová práce je velmi kvalitní. Diplomant prokázal schopnost dobře teoreticky i prakticky uchopit problematiku v oblasti moderních technik hmotnostní spektrometrie a chromatografických metod při analýze reálných biologických vzorků. Výše uvedené připomínky nikterak nesnižují kvalitu předložené diplomové práce a proto ji doporučuji přijmout k obhajobě s hodnocením výborně.

V Hradci Králové dne 22.5. 2014



Ing. Miloš Hroch, Ph.D.

Ústav lékařské biochemie

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Hradci Králové