



Posudek na disertační práci

Název práce: Využití HPLC-HRMS pro studium látek ze skupiny takrinu potenciálně využitelných v terapii Alzheimerovy choroby

Autor: Mgr. Martin Novák

Školitel: doc. PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Konzultant: doc. Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Předkládaná disertační práce Mgr. Martina Nováka se zabývá využitím kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s vysokou rozlišovací schopností a správností určení m/z pro studium takrinových látek potenciálně využitelných při terapii Alzheimerovy choroby. Jedná se o analytickou práci z vysoce aktuální oblasti vývoje potenciálních léčiv, kde má LC-MS technika nezastupitelnou roli při charakterizaci nových molekul. Autor v práci využil pokročilých technik kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie pro studium absorpce a charakterizace metabolismu molekul takrinu, 7-methoxytakrinu a jeho derivátů, 6-chlortakrinu a 7-fenoxytakrinu. Práce vznikla na pracovišti Centra biomedicínského výzkumu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové, které se danou problematikou dlouhodobě zabývá.

Předkládaná práce má formu kompilátu publikovaných prací doplněných teoretickou částí a komentářem k publikovaným pracím. Celkově je práce psaná čtivou formou na velmi dobré úrovni s minimálním množstvím překlepů. Z formálního hlediska lze práci přesto vytknout několik dílčích nedostatků. Autor nepoužívá systematicky definované zkratky, kdy se zkratky v textu střídají s plným textem. V seznamu použitých zkratek jsou nesprávně uvedené některé názvy technik, které jsou však ve vlastním textu definovány správně (např. MALDI je laserová desorpce za účasti matrice, APPI je fotoionizace za atmosférického tlaku, detektor doby letu vs. analyzátor doby letu apod.). Autor se nevyhnul ani časté záměně termínů přesnost a správnost m/z nebo rozlišení a rozlišovací schopnost. Dále bych doporučil používat termíny normální mód místo nepolární, obrácený mód místo reverzní, podobně dávkování místo vstřikování iontů do pasti.

Teoretická část práce podává přehled o vzniku, příčinách a léčbě Alzheimerovy choroby, včetně nových směrů vývoje potenciálních léčiv. Dále autor podrobně diskutuje studium farmakokinetiky nových molekul, vybrané teoretické základy kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie a specifika analýzy biologických vzorků. Zastoupení jednotlivých kapitol však není s ohledem na zaměření práce dobře vyvážené. Autor například popisuje do podrobností hodnocení chromatografických separací pomocí různých parametrů, které ale nejsou nikde v pracích využity. Podrobně jsou popisovány měřicí módy orbitrap hmotnostního spektrometru, které jsou ale čistě záležitostí daného komerčního přístroje a nejsou nijak diskutovány v kontextu práce. V práci naopak zcela chybí rešerše k analytickým metodám a podmínkám využívaných v literatuře při LC-MS hodnocení léčiv, což je hlavní cíl předkládané práce. Náznak takové diskuze je jen v poslední kapitole 2.5 Specifika analýzy biologického materiálu. Ve srovnání se zbytkem Teoretické části je však tato kapitola psaná velmi stručně až heslovitě bez hlubšího rozboru problému.

Experimentální část představuje komentář 4 publikovaných prací, které jsou základem předkládané závěrečné práce. Jedná se o práce z oblasti medicínské chemie, které zahrnují chemickou syntézu až charakterizaci farmakokinetiky připravených molekul. Hlavním cílem prací je charakterizace molekul se zaměřením na potenciální hepatotoxicitu látek s různou strukturní obměnou. Podíl autora na těchto pracích spočívá zejména v testování látek pomocí LC-MS, které autor v komentáři stručně popisuje společně s důležitými závěry. Autor se zabýval určením identity látek, stanovením jejich čistoty, testováním schopnosti prostupovat přes hematoencefalickou



bariéru nebo stanovením farmakokinetiky látek v animálních modelech. Významnou část práce představuje hodnocení biotransformace a toxicity takrinu a vybraných derivátů, kde LC-MS technika hraje zásadní roli. Celkově práce systematicky charakterizují vybraná potenciální léčiva a jejich analogy a snaží se o posouzení teorie hepatotoxicity takrinu na základě detailní studie vznikajících metabolitů. Získané poznatky jsou důležité pro širokou odbornou veřejnost z hlediska dalšího vývoje potenciálních léčiv Alzheimerovy choroby.

3 ze 4 prezentovaných prací jsou publikovány v časopisech Q1 a 1 práce v časopise Q2 dle AIS v oborech medicínální chemie, farmakologie, analytické chemie a biochemie. U prvních dvou prací je M. Novák v rámci širšího kolektivu autorů a jeho podíl byl dle příloženého popisu zejména ve vývoji metody a samotné LC-MS analýze. Vývoj LC-MS metod však není ani v jednom případě diskutován (kromě testování úpravy vzorku) a není ani součástí diskuze publikovaných prací. U dalších dvou prací je M. Novák prvním autorem s hlavním podílem v podobě vývoje metod, LC-MS analýzy, interpretace dat a zpracování publikací. M. Novák je i spoluautorem dalších 9 publikací, které nejsou součástí předkládané závěrečné práce. Dále je autorem řady přednášek a plakátových sdělení na konferencích, členem kolektivu vědeckých projektů a absolvoval odbornou zahraniční stáž. S ohledem na počet i kvalitu výše uvedených výstupů kandidát jednoznačně prokázal schopnost samostatné vědecké činnosti.

K předkládané práci mám následující náměty do diskuze:

- 1/ Jaký byl způsob identifikace vzniklých metabolitů studovaných látek vč. identifikace izomerů? Jaká byla použita kritéria (LC i MS) pro jejich identifikaci?
- 2/ Identifikace 7-Feota se správností 10 ppm je značně za možnostmi použitého HRMS přístroje. Čím podle autora byla způsobena výrazně horší správnost m/z?
- 3/ HRMS přístroje přinášejí nesporné výhody při studiu biotransformace látek. Na druhou stranu se jedná o nákladnou instrumentaci, která není dostupná ve všech laboratořích. Bylo by možné pro studium využít (případně s jakým omezením) i méně nákladné instrumentace v podobě např. trojitého kvadrupólu?
- 4/ Určit zastoupení metabolitů s dostatečnou správností a přesností ve složitých biologických matricích pomocí MS je poměrně komplikovaná záležitost. Jaká jsou omezení postupů použitých v pracích autora a jaké jsou další možnosti pro vylepšení? Byl při prováděných experimentech zaznamenán významný matricový efekt?

Závěrem mohu konstatovat, že předkládaná práce Mgr. M. Nováka splňuje všechny požadavky kladené na disertační práci, proto ji bez výhrad **doporučuji přijmout k obhajobě.**

doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.
Katedra chemie

V Hradci Králové dne 22. září 2023