

Pan Mgr. Jiří Binder vypracoval na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze dizertační práci na téma *In silico* studium interakcí cholinesteras s jejich modulátory a návrh nových látek tohoto typu. Za cíle práce si autor vytknul syntézu a testování aktivity mono- a biskvartérních inhibitorů cholinesteras za účelem doplnění informací o vztazích mezi strukturou a aktivitou tohoto typu biologicky účinných látek a ověření funkčnosti molekulárního dockingu v této oblasti. Získané poznatky měly poté sloužit k návrhu struktury nového účinného typu acetylcholinesterasy.

Teoretická část práce připomíná čtenáři informace o acetylcholinu, jeho receptorech, cholinesterasách, jejich inhibitorech a reaktivátorech. V souvislosti s inhibitory cholinesteras jsou zde zmíněny dvě choroby, u nichž se tyto látky používají jako léčiva: Alzheimerova choroba a *myasthenia gravis*. Zbytek teoretické části je věnován zestručněné teorii molekulového modelování. Metodická část se věnuje metodám stanovení inhibiční aktivity látek vůči cholinesterasám titrimetrickou a nepřímou fotometrickou metodou. Závěrečná část kapitoly pojednává opět o molekulovém modelování, zde je popsán konkrétní postup použitý v experimentální části práce. Kap. 5. Experimentální část uvádí zestručněné protololy syntéz substituovaných methypyridinium-jodidů a dále bis-kvartérních sloučenin, u nichž jsou dva kvartérní pyridioné kationty spojeny můstkem z několika methylenů, přičemž pyridinová jádra jsou buď samostatná, nebo součástí isochinolinového systému. Kapitola pokračuje výsledky hodnocení připravených monokvartérních inhibitorů acetylcholinesterasy (AChE), vyjádřenými jako IC_{50} , doprovázenými vypočtenými hodnotami $\log P$ a TPSA. Následují výsledky dockingu jednotlivých připravených sloučenin do aktivního místa AchE. K dockingu byly přibrány i látky, syntetizované a publikované dříve za účasti autora práce. Výsledky dockingu autorovi umožnily navrhnout řadu heterocyklických potenciálních inhibitorů AchE, sestávajících z jednoho heteroaromátu s kvartérním dusíkem a nejméně jednoho dalšího se sekundárními a terciárními dusíky, a odhadnout jejich vazebné energie do aktivního místa enzymu. Kapitola Diskuze se věnuje vztahům mezi strukturou v práci studovaných i strukturně souvisejících sloučenin a jejich schopností vázat se na jednotlivá vazebná místa v kavitě cholinesteras a vysvětluje, jak autor dospěl k látkám teoreticky navrženým a na základě dockingu vybraným jako nejvhodnější. Kapitola Závěr je zestručněným souhrnem práce.

Připomínky:

1. Seznam zkratk není kompletní.
2. Na mnoha místech je použit termín „výťažnosť“ namísto „výťažek“.
3. Totožnost připravených látek byla ověřena pouze 1H - a ^{13}C -NMR spektry. Doplnění IR, popř. MS spekter by rozhodně neškodilo, stejně jako shoda teploty tání s teplotou z literatury, pokud se jedná o látky popsané.
4. V názvech bis-kvartérních produktů v jejich syntetických protokolech se vyskytují zbytky anglického názvosloví (K211, K341, K345).
5. Z textu kapitoly 5.2.7 Návrh nových struktur a z tabulek 5 a 6, náležejících k této kapitole, není zcela jasné, jaké struktury byly vlastně dokovány. V textu na str. 105 je uvedeno: „Obecný návrh struktury můžeme tedy vyjádřit jako X-R-Z, kde Y a Z jsou aromatické systémy a R je spojovací řetězec.“ Tedy, namísto X-R-Z patrně patří Y-R-Z, což souhlasí i se záhlavím tabulek 5 a 6. Jenže v tabulkách jsou uvedeny pouze části molekul R a Y, fragment Z chybí, takže struktury nelze dát dohromady. Navíc z položek, jak jsou v tabulkách uvedeny, nevyplývá jednoznačně, kam je spojovací fragment R na oba koncové heterocykly vázán. Výsledky dockingové simulace jsou sice dále podrobněji rozepsány, ale jen pro několik vybraných látek a strukturní vzorec je uveden jen u látky JBT316. Struktury látek JBT148 a JBT57 jsou uvedeny dále v Diskuzi. *Doplňte alespoň v prezentaci a v autoreferátu.*
6. V Diskuzi poněkud postrádám konkrétnější srovnání výsledků práce s výsledky jiných autorů, eventuelní shodu či polemiku, a zřetelnější zasazení práce do kontextu výzkumu v

dané oblasti. Pokud je zde srovnání uvedeno, není zcela zřejmé, s čím se srovnává. Vysvětlíte např. větu ze str. 121 „Rovněž tak byla pozorována možnost vazby takrinu v PAS, jakožto druhého nejpočetnějšího klastru. Vazebná energie je jen o 1 kcal/mol nižší, ale v krystalografických studiích nebyla nikdy pozorována.“ Vazebná energie vazby takrinu do PAS je o 1 kcal/mol nižší než jaká jiná vazebná energie? Vazebná energie téhož do esteratického místa? Tento výsledek patrně není v předkládané práci obsažen? Citace však uvedena není.

Dotazy:

1. V práci postrádám zhodnocení, které z Vámi připravených sloučenin jsou nové a v literatuře dosud nepopsané. Uveďte tento přehled.
2. Co přesně je IC_{50} u inhibitoru enzymu a jaký je princip jejího stanovení?
3. Jaký je vztah mezi vazebnou energií, vypočtenou pomocí dockingu, a IC_{50} ?
4. V protokolech syntéz látek K341 a K344 máte uvedeno „T.t. neměřena (amorfni)“. Jste přesvědčen, že u látek, které se jeví jako amorfni, nelze teplotu tání změřit? Látky jsou členy homologické řady 1,1'-oligoalkylenbispyridinium-dibromidů, u jejichž ostatních členů teploty tání změřené máte, takže je reálný předpoklad, že jsou změřitelné i u těchto dvou sloučenin.
5. V kapitole 6. Diskuse na str. 120 píšete, že pro testování *in vitro* byla použita „myši nebo lidská rekombinantní AchE a lidská plazmatická BchE“, zatímco v kapitole 4. Metodika na str. 54 uvádíte, že „jako zdroj enzymu byl použit 1% (w/v) homogenát mozku bílého laboratorního potkana (kmen Wistar)“. Jak to tedy bylo?
6. Bis-kvarterní ammoniové sloučeniny, působící v cholinergním systému, se nacházejí též v jiné terapeutické skupině, než jsou léčiva vzácné *myasthenia gravis*. O jakou skupinu a jaké konkrétní látky se jedná?
7. Celý rozsáhlý soubor sloučenin, uvedený ve Vaší práci, jste studoval jako potenciální inhibitory cholinesteras. Uvažoval jste však i o jejich možné přímé interakci s acetylcholinovými receptory a tom, jak by mohla jejich předpokládaný účinek ovlivnit? V této souvislosti nacházím ve vaší práci zmínku pouze o 10-methylakridinium-jodidu, ten je zde však zmíněn jen jako látka dokovaná pro porovnání s Vašimi monokvarterními deriváty. Mimochodem, tvrdit, že Vaše jednojaderné monokvarterní deriváty zaujmou v kavitě enzymu obdobné sendvičové uspořádání, jako trojjaderný akridinový derivát, mi připadá poněkud odvážné. Avšak, jak by se asi v těle chovaly Vaše bis-kvarterní sloučeniny, a jak dokované látky ze sérií REF a JBT?
8. Na jakém počítači či počítačích jste prováděl Vaše dokovací a související výpočty? (V Metodice to není uvedeno.) Kolik strojového času bylo přibližně potřeba na provedení všech Vašich výpočtů?

Závěr posudku

Z textu práce je zřejmé, že za předkládanými výsledky se skrývá značné množství práce výpočetní i syntetické, byť syntetické postupy jsou velmi jednoduché. Cíle práce byly beze zbytku splněny. O odborné úrovni uchazeče svědčí i vlastní publikované články, jejichž seznam je uveden na konci práce, a zejména 4 články v časopisech s IF, které jsou do dizertační práce přímo vloženy. I přes uvedené připomínky práce splňuje požadavky, kladené na tento typ kvalifikačních prací, a proto ji doporučuji k obhajobě jako práci dizertační.