

## Oponentský posudek disertační práce

Autor: RNDr. Martin Uher  
Název: Hodnocení metabolismu a exkrece endogenních látek a xenobiotik  
Obor: Lékařská chemie a biochemie

Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium, sestavení, validaci a aplikaci metodiky pro stanovení endogenního obsahu žlučových kyselin v autentických matricích biologických vzorků. Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část s dílčím dělením kapitol, které odpovídá odborným rukopisům. Toto dělení považuji jednak za velmi přehledné a atraktivní, ale také za účelné a efektivní neboť metoda stanovení endogenního obsahu žlučových kyselin je již součástí dvou publikací využívajících zvířecí modely (2021 a 2022) a zároveň odeslána do prestižního časopisu *Journal of Chromatography A*, kde v současnosti podléhá recenznímu řízení (2023). Společně s dalšími pěti bioanalyticky zaměřenými publikacemi z let 2020-2022 uchazeč jednoznačně prokázal své odborné kvality.

Teoretická část je zpracována jasně, stručně a přehledně, s důrazem na strukturu a metabolismus žlučových kyselin a jejich stanovení pomocí moderních přístupů hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií. Prakticky jedinou výtku mám k využívání neformálních či slangových výrazů ("hmota" – poměr hmotnosti k náboji, "spektrometr s vysokým rozlišením" – spektrometr s vysokou rozlišovací schopností) a využívání již nedoporučované terminologie ("přesnost" – preciznost, "správnost" – pravdivost, "MRM" – SRM, "rodičovský, dceřiný ion" – prekurzorový a produktový ion).

Experimentální část je opět velmi pěkně strukturovaná dle rukopisných zvyklostí a obsahuje velké množství dat s ohledem na provedenou validaci celé metodiky. Některé validační parametry byly testovány ve větší šíři než vyžadují validační kritéria, což činí celou metodu i validaci velmi robustní. Drobnou výtku mám opět k uvádění již nedoporučovaných pojmů přesnost a správnost, neuvedení některých experimentálních podmínek (specifikace desolvatačního a kolizního plynu) a absenci nejistot některých parametrů, např. směrnice kalibračních křivek. Tabulka 3 uvádí výsledky biochemického vyšetření v autentické a stripované plazmě s tím, že některé hodnoty u stripované plazmy jsou uvedeny jako nulové. Jedná se opět o neformální vyjádření, které by bylo vhodnější uvádět jako např. nižší než limit detekce/kvantifikace. Přestože výsledky získané z biochemických analyzátorů často nezahrnují limity detekce, kvantifikace, či odhady nejistot, je třeba neustále vyvíjet tlak na výrobce či uživatele, aby takové informace dostupné byly. Rozhodovací analýza by vždy měla vycházet z kvantifikace nejistoty a nikoliv pouze z dichotomizovaných výsledků. S tím souvisí i absence zdůvodnění volby hladiny významnosti prováděných statistických testů, které by mělo vycházet z prevalence předpokládané alternativní hypotézy a nikoliv používat hodnotu, která je naprosto bezdůvodně rozšířená. Uvedené připomínky však nijak nesnižují vysokou vědeckou úroveň práce, její koncepci a aplikační využití. Kvantifikaci žlučových kyselin pomocí LC MS v diagnostice intrahepatální cholestázy u těhotných považuji za obrovský přínos a dokázal bych si v budoucnu představit i sestavení robustního klasifikačního modelu s definovanými kritérii (ROC, PPV) pro klinické využití zejména s ohledem na nízkou prevalenci tohoto onemocnění (< 1 %).

Závěrem lze uvést, že disertační práce RNDr. Martina Uhera splnila požadavky kladené na disertační práci v daném oboru a zároveň prokázala jeho schopnost samostatné vědecké práce. Předchozí drobné komentáře nijak nesnižují celkově velmi

dobrou úroveň práce, kterou jako celek hodnotím výborně a jednoznačně ji doporučuji k obhajobě.

K předkládané práci mám následující otázky či náměty do diskuze:

1. Jak vidíte budoucí přínos v práci použité metody nastavení referenční hodnoty v autentické matici pomocí zástupné matrice při analýze endogenních látek ve srovnání s metodou přidavku standardu či zástupného analytu v autentické matici a autentického analytu v zástupné (umělé/striповané) matici? Zejména při porovnání ekonomické a časové stránky.
2. Jaký je Váš názor na reálné využití striповané/umělé matrice při analýze endogenních látek? Zajímalo by mne zejména možnosti testování robustnosti maticních efektů.
3. Jakým způsobem byla provedena optimalizace "pseudo-MRM" módu pro nekonjugované žlučové kyseliny? Kolizní energie uvedené v Tabulce 1 (10 eV) mi přijdou relativně vysoké a očekával bych ztrátu citlivosti oproti hodnotám např. kolem 1 eV.

V Brně, 11.5.2023

doc. Mgr. Ondřej Peš, Ph.D.