

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra Biologických a lékařských věd

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Posudek oponenta bakalářské práce

Rok obhajoby: 2022

Autor/ka práce: **Barbora Hejtmánková**

Vedoucí práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant/ka: RNDr. Martina Hrabínová, Ph.D.

Oponent/ka: PharmDr. Adam Skarka, Ph.D.

Název práce: **Validace purifikace enzymu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy**

Rozsah práce: 57 stran, 21 obrázků, 9 tabulek, 53 citací

Hodnocení práce:

- | | |
|--|--------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části: | velmi dobrá |
| b) Náročnost použitých metod: | velmi dobrá |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost): | velmi dobré |
| d) Kvalita získaných experimentálních dat: | dobrá |
| e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost): | dobré |
| f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy: | dobré |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků: | nedostatečná |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů: | nedostatečná |
| i) Splnění cílů práce: | dobré |
| j) Množství a aktuálnost literárních odkazů: | dobré |
| k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň): | velmi dobrá |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | dobrá |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení:

Předložená práce se zabývá zajímavým procesem výběru správné purifikační metody pro enzymy AChE a BChE. Z vlastní zkušenosti je mi známo, že při správném provedení purifikace jsou výsledky jsou zcela opačné, než je zde prezentováno. Očekával jsem tedy podložení výsledků jednoznačnými daty a diskuzí s aktuální literaturou. Bohužel k mé lítosti se zde neobjevuje ani jedno a nemohu tedy s uvedenými závěry souhlasit. Oceňuji laboratorně provedenou práci, avšak celek bohužel sráží obrovská spousta chyb a nepřesností, které mohly být odstraněny důkladnou konzultací se školitelem-specialistou.

Dotazy a připomínky:

Teoretická část

Obecně – Je pracováno s velkým množstvím odborných termínů, které dle mého názoru nelze přeložit do češtiny. Vhodnější je uvedení původního termínu v uvozovkách.

Str. 13 – Zřejmě došlo ke smazání citace? Viz „Chyba! Nenalezen...“ Tato chyba se objevuje ještě nekolikrát.

Str. 15 a 16 – Dvakrát vložený obrázek. Jednou v textu a jednou mimo text.

Str. 18 – Informace o metabolitech vláknitých hub je dle mého názoru nepodstatná pro danou práci.

Str. 18 – Nesouhlasím s tvrzením, že purifikace je finálním krokem produkce rekombinantního enzymu. Autorka by se měla zkusit zamyslet nad tím, proč?

Str. 18 – „Molekulová vylučovací chromatografie“ není správný termín pro purifikační techniku. Předpokládám, že se jedná o „Size exclusion chromatography“.

Str. 19 – Prosím o vysvětlení termínu „tandemové řazení tagů“.

Str. 19 – Imidazolem vymývat nelze, protože se jedná o pevnou látku. Správně by mělo být roztokem nebo pufrům obsahujícím imidazol.

Str. 19 – „Gravitační kolona“. Co je tím myšleno? Kolona, která pracuje s gravitací?

Str. 20 – „Vynalezena“ není vhodný pojem. Spíše se hodí „připravena“.

Str. 21 – Měření koncentrace proteinu nelze využít pro měření čistoty.

Praktická část

Chemikálie a materiál

Obecně – Když už je někde uveden výrobce včetně města a státu, mělo by to být dodrženo všude.

Str. 22 – U chemikálií by měla být uvedena jejich čistota. U kitů a hotových pufrů by mělo být uvedeno produktové číslo.

Metodika

Str. 24 – Opět chyba s neexistujícím odkazem.

Str. 24 – Chybí mi zde, o jaký typ purifikace se jednalo. Je rozdíl v tom, jestli je kolona napakována předem nebo došlo k prostému smíchání pryskyřice s mediem (batch chromatografie).

Str. 24 – Uvádíte, že dialýza probíhala přes noc a zároveň, že výměna pufru byla po dvou hodinách. To autorka zůstávala v laboratoři přes noc, aby měnila pufr?

Str. 26 – EXPI medium není kompatibilní s žádnou Ni-NTA pryskyřicí, i když se to u některých z nich tvrdí. Došlo u supernatantu s BChE před nanesením na kolonu také k dialýze? Tato informace zde chybí.

Str. 26 – Sice je uvedeno složení elučního pufru pro hupresin, avšak nikde není uvedena výsledná látková koncentrace trimethylamonium chloridu. Může se tedy stát, že by v případě použití jiné čistoty chemikálie, byla rozdílná koncentrace.

Str. 32 – Nemělo by zde spíše být 300 delta-mAU/min nebo 0,3 delta-AU/min?

Str. 32 – Jakým způsobem byl přidáván substrát? Protože při zvolené aktivitě 0,3 delta-AU/min je ruční přidávání po jamkách zcela nedostatečné.

Str. 32 – Obrázek 9. Uvedený vzorec je velmi zvláštní. Pokud bych vzal v potaz, že je v ideálním případě aktivita enzymu 1 a inhibovaného enzymu 0, tak pomocí vzorce bych získal výslednou aktivitu 0 % $(1-(1-0)/1)*100$. Prosím o vysvětlení.

Str. 32 – Obrázek 10. Uvedený vzorec pro výpočet specifické aktivity je chybný. Jednotky jsou sice správně, ale jednotka U (umol/min) opravdu není průměrná hodnota absorbance.

Str. 33 - Opět hned dvakrát chyba s neexistujícím odkazem.

Str. 33 – Nesprávná definice V_{max} . Tato veličina je dána jako maximální rychlost reakce, kdy je všechen enzym saturován substrátem. Dle mého názoru se spíše jedná o kostrbaté vyjádření K_m .

Str. 33 – etopropazin se píše s malým písmenem na začátku.

Výsledky

Str. 34 – Uvedený obrázek SDS-PAGE gelu nevypovídá o přílišné čistotě purifikovaného enzymu. Velmi zde chybí obrázek western blottingu, který dle metodiky byl také proveden. Zároveň bych k danému měl otázku. Byla provedena SDS-PAGE pro všechny purifikační frakce? Mám tím na mysli celou řadu supernatant, nezachycená část, všechny promývací frakce, eluční frakce? Toto patří ke standardní prezentaci jednotlivých kroků purifikace enzymu. Jestliže toto provedeno bylo, byl by obrázek k dispozici?

Str. 35 – Všechny výpočty specifické aktivity jsou nesprávné, viz má předchozí poznámka ke straně 32. Např. průměrná hodnota specifické aktivity pro čistou BChE udávaná v publikacích se pohybuje mezi 600-1000 U/mg, což je řádově několikanásobně jinde než Vámi uvedené hodnoty.

Str. 37 a 38 – Uvedené grafy sice paradoxně ukazují inhibici AChE substrátem, ale v žádném případě se nejedná o graf inhibice, nýbrž o standardní grafické vyjádření závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu dle Michaelis-Mentenové. U BChE se o inhibici substrátem ani nejedná. Dále, pro přesnější výpočet K_m a V_{max} by již inhibující hodnoty měly být vyřazeny.

Diskuze

Obecně – Diskuze zjištěných výsledků s již publikovanými informacemi se v práci téměř neobjevuje. Vesměs se jedná o opakování teorie nebo výsledků. Je to škoda, protože autorka svými experimenty zjistila jiné hodnoty, než ty, se kterými se běžně pracuje a běžně se prezentují a bylo by tudíž velmi zajímavé je také porovnat s již známými informacemi.

Str. 42 – Osobně bych byl velmi opatrný s interpretací SDS-PAGE gelu, protože v jednotlivých sloupcích je viditelně nanášeno jednak příliš velké a také rozdílné množství proteinu. Určitě zde není vidět žádné znečištění proteiny < 70 kDa, protože obarvení sloupce č. 3 nebo č. 7 nesouvisí s přítomnými proteiny. Pro proteiny > 70 kDa by se po úpravě histogramu ve výsledku jednalo o téměř ty samé nečistoty v obou metodách purifikace. Až z daného mám dojem, že sloupce 3 a 4 a dále 7 a 8 ukazují vždy ten samý vzorek, akorát s rozdílnou koncentrací. Ale jedná se pouze o mou domněnku.

Závěr

Str. 46 – Použití Amicon kolon mělo být zpracováno v praktické části a nikoliv v závěru. Dále, pokud je mi známo, tak Amicon nejsou kolony, ale membránové centrifugační zkušavky. A co je nejdůležitější, mám to chápat tak, že došlo v průběhu vypracování práce ke změně v laboratorních postupech? Proč tyto postupy nejsou uvedeny v praktické části?

hodnocení, práce je: dobrá

V Hradci Králové

24. května 2022

k obhajobě: doporučuji

podpis oponenta/ky

