

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Studijní program: Farmacie

Posudek oponenta diplomové práce

Autor/ka práce: **Miriama Dulinová**

Vedoucí/školitel/ka práce: prof. PharmDr. Martin Doležal,
Ph.D.

Rok obhajoby: 2018

Konzultant/ka práce: prof. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.,
DSc.

Oponent/ka práce: PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.

Název práce:

Enzymové testy s vázanou cholinesterázou k charakterizaci léčiv Alzheimerovy choroby

Rozsah práce: počet stran: 53, počet obrázků: 19, počet tabulek: 4, počet citací: 57

Práce je: experimentální

- a) Cíl práce je: zcela splněn
- b) Jazyková a grafická úroveň: výborná
- c) Zpracování teoretické části: velmi dobré
- d) Popis metod: velmi dobrý
- e) Prezentace výsledků: dobrá
- f) Diskuse, závěry: výborné
- g) Teoretický či praktický přínos práce: výborný

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

Případné poznámky k hodnocení: DP M. Dulinové byla řešena v laboratořích Katedry molekulární patologie a biologie FVZ UO v Hradci Králové. Cílem DP bylo imobilizovat acetylcholinesterasu (AChE) do polymerní matrice (membrány) a stanovit aktivitu takto ukotveného enzymu izolovaně či v přítomnosti známých inhibitorů. Tyto pokusy byly úspěšné částečně v tom smyslu, že imobilizovaná AChE sice vykazovala očekávanou aktivitu, ale po promytí v matrici nevydržela – nemůže se tak uplatnit předpoklad opakovaného využití takového systému jako biosenzoru. I přesto je nesporné, že výsledky DP budou školícímu pracovišti přínosné na cestě k vývoji biosenzorů založených na imobilizované AChE. Oceňuji, že studentka vykonala velké množství laboratorní práce, je ovšem nutno poznamenat, že v DP se vyskytují nedostatky v experimentálních popisech a chyby v prezentaci naměřených dat (viz níže).

Práce obsahuje nezanedbatelné množství překlepů a typografických chyb (tyto předčítat nebudu):

- V poděkování špatně uvedena zkratka podplukovníka
- IC50 - „50“ není často v dolním indexu
- V seznamu obrázků a tabulek není (většinou) mezera mezi „č.“ a číslem obrázku
- Obrázky (často) nejsou odkazovány v textu.
- Chyby v číslování nadpisů od str. 35 (Donepezil nemá být 1.1.1, nýbrž 8.2.2 atd.).
- Ref. 50 na str. 42, poslední řádek, má být pravděpodobně ref. 51

- Ref. 57 mino pořadí.

V experimentální části nejsou některé postupy dostatečně popsány. Opakovaně se hovoří o rozpouštění (např. příprava roztoků inhibitorů, příprava roztoku želatiny), ale není uvedeno, co je rozpouštědlem. U ukotvené AChE se hovoří o promývání květy a opakovaném testování aktivity enzymu, ale chybí popis, jak a čím bylo promýváno a jaká činidla se pro opakované měření přidávala. Tyto informace se čtenář částečně dozví až v diskusi. Několikrát je v práci odkazováno na podmínky či postupy nastavené dle předchozích studií bez odkazu a tyto studie (např. na str. 39, sekce 8.3.2.1, příprava chitosanové membrány).

V odbornějších pasážích práce často trpí nesprávnou terminologií: kavita AChE přeložena jako roklina, katalytický trojúhelník místo katalytické triády, na str. 12 označení AChE jako elipsy co do tvaru (elipsa je přeci 2D obrazec, což enzym být nemůže).

Nejzávažnější chybou v DP jsou poté grafy na obr. 8–12, kde je nesprávně uvedeno, že na ose x je ZÁPORNÝ dekadický logaritmus koncentrace inhibitoru. V této podobě grafy nedávaly smysl (inhibitory neinhibovaly). Po vyžádání si zdrojových dat od diplomatky vyšlo najevo, že na ose x je ve skutečnosti vynesena kladný dekadický logaritmus koncentrace inhibitoru. Dále hodnoty IC₅₀ uvedené a diskutované v textu a shrnuté v Tab.2 neodpovídaly průběhu křivky v grafech. Ze zdrojových dat a po konzultaci s diplomatkou vyšlo najevo, že hodnoty IC₅₀ v Tab. 2 odpovídají ve skutečnosti koncentracím inhibitorů PŘED jejich přidáním do měřící květy. Skutečné koncentrace inhibitorů v květi a skutečné IC₅₀, které byly odečtené z grafů, jsou tak 10x nižší než ty, které jsou uvedeny v Tab. 2 a diskutovány v závěru práce. Doporučuji v této souvislosti po obhajobě DP vypracovat a přiložit Errata.

Připomínky:

- u dodavatelů přístrojů a chemikálií (zvláště těch méně známých) by bylo lépe uvést i bližší určení (město, země)
- Výsledky by mohly být logičtěji prezentovány. V experimentální části např. popisujete nejprve stanovení aktivity samotné AChE a poté aktivity inhibované AChE. Ve výsledkové části naopak začínáte tabulkou č. 2 s IC₅₀ pro inhibitory, v další sekci uvádíte výsledky pro neinhibovanou AChE, abyste se posléze vrátila k výsledkům inhibované AChE ve formě grafů.
- Grafy na obr. 9–12 mají oproti grafu na obr. 8 opačný směr osy x. Formálně je to správně, ale ve výsledku to znehledňuje situaci, protože křivka pro substrát má potom stejný průběh jako křivka pro inhibitory.

Dotazy a připomínky:

1. Na str. 11 uvádíte, že tau protein se tvoří v intracelulárním neurofibrilárním klubku (NFT). Je tomu skutečně tak? Případně přeformulujte.
2. Na str. 12 uvádíte, že AChE je molekula s nízkou molekulovou hmotností. Co si pod tímto pojmem mám představit? V kontextu farmaceutické chemie považujeme například za nízkomolekulární léčivo s relativní molekulovou hmotností < 500. Jaká je přibližně hmotnost lidské AChE? V jakých jednotkách se hmotnost proteinů obvykle udává?
3. Na str. 14 uvádíte, že „Dalšie zlúčeniny, ktoré vykazujú inhibičný účinok na cholinesterázy sa používajú na liečbu chorôb ako je ... Parkinsonova choroba.“ Ověřte a případně upravte své tvrzení. U Parkinsonovy nemoci je patologicky převaha acetylcholinu nad dopaminem, takže se k symptomatické léčbě naopak používají cholinolytika.
4. Na str. 15 uvádíte, že hodně inhibitorů AChE karbamátového typu neproniká do CNS. Na čem závisí, zda bude inhibitor karbamátového typu procházet do CNS či nikoliv? Případně uveďte příklady konkrétních sloučenin.
5. V práci užíváte jako síťovací činidla glutaraldehyd a couplingové činidlo EDC. Jaké typy vazeb mohou ať už v rámci membránových polymerů želatiny a chitosanu nebo mezi membránou a AChE vznikat?

Celkové hodnocení, práce je: velmi dobrá, k obhajobě: doporučuji

V Hradci králové dne 28. 5. 2018

.....
podpis oponentky / oponenta