



Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie



Hodnocení diplomové práce

Posudek oponenta



Jméno autora: Daniel Zhouf

Rok obhajoby: 2020



Název práce: Reaktivace lidských cholinesteráz imobilizovaných na stacionárních fázích



Vedoucí práce: PharmDr. Rudolf Andrýs, Ph.D.

Oponent práce: doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.



Téma práce:	aktuální
Téma bylo v literatuře:	je výjimečné
Zaměření práce:	původní vědecká práce
Práce je zaměřena:	empiricky
Jazyková a stylistická úroveň práce:	odpovídá
Rozsah práce:	přiměřený
Použitá literatura:	aktuální
Počet uváděných titulů:	dostatečný
Citace v textu:	přiměřená
Statistické zpracování výsledků:	nebylo v náplni práce
Formální stránka práce:	odpovídá
Využitelnost pro praxi:	střední
Cíl práce:	splněn
Úroveň práce:	odpovídá požadavkům

Konkrétní náměty, připomínky nebo otázky vyžadující doplnění u obhajoby:

Diplomová práce studenta Daniela Zhoufa je experimentální práce zabývající se imobilizací lidských cholinesteras a jejich využití při stanovení účinnosti reaktivátorů in vitro. Práce se skládá ze všech částí obvyklých pro diplomovou práci. Nejdelší částí práce je teoretický úvod, který ale není příliš kvalitní, není zcela dobře strukturován (jak celkově tak i na úrovni jednotlivých úrovní kapitol), fakta se opakují na více místech, obsahuje řadu chyb či formulačních nepřesností (první chyba je hned druhé větě, více v sekci připomínky). Navíc je velmi patrné, že jde o odstavce "vytrhané" z jednotlivých zdrojů, protože některé části na sebe myšlenkově nenasazují a netýkají se příliš obsahu práce. Popis použitých metodik je také dost nejednoznačný, není jasné množství částic či

koncentrace inhibitorů použité v reakční směsi (viz připomínky). Bohužel i sekce výsledky a diskuse je poměrně slabá, popis výsledků je chaotický, nejasný, tabulky a obrázky se v podstatě dublují. Navíc snaha o diskusi také pokulhává. Vzhledem k tomu, že koncept imobilizace AchE a BuchE nefungoval zcela dle původních představ, témat k diskusi se nabízela celá řada. V práci bylo použito 62 literárních zdrojů z nichž řada jsou aktuální články ve vědeckých časopisech, při čtení práce se ale zdá, že bylo použito pouze pár zdrojů, které se stále opakují (hojně jsou používány zejména články z Chemických listů, např. [8], [34]) a ostatní jsou "do počtu", též jejich citace nejsou mnohdy správné (viz sekce připomínky).

Celkově lze shrnout, že se jedná velmi slabou práci jak z ohledu experimentálního tak z ohledu samotného zpracování. Přípomínek a otázek (které se nabízí díky řadě chybějících faktů) uvádím několik stran a i tak se jedná pouze o výběr. I přes poměrně velké výhrady doporučuji práci k obhajobě, která doufám, řadu chybějících faktů a nejasností pomůže osvětlit.

Připomínky:

Práce obsahuje celou řadu chyb a nepřesností z nichž některé uvádím:

- str. 12 - "v podstatě se jedná o složené proteiny..." - enzymy mohou být i jednoduché proteiny, což i dále uvádíte. Uvádí se, že v nejjednodušších buňkách se vyskytuje 3000 a nikoliv 300 enzymů (viz i vaše zdroje 1 a 2)
- str. 13 - "každý enzym (myšleno cholinestrazy) poskytuje dvě důležitá tzv. aktivní centra". Cholinestrazy mají pouze jedno aktivní místo, anionické místo je součástí aktivního centra, slouží k vazbě substrátu, nikoliv samotné reakci. "...rozeznáváme dva typy těchto esterů..." - bylo myšleno dva typy enzymů
- str. 13-16 - v sekci cholinestrazy a acetylcholinestrasa se zbytečně opakuje role AchE na synapsi. V této části chybí zcela základní informace o enzymech AchE a BuchE, jako je jejich velikost, struktura, počet podjednotek, rozdíly v aktivním místě (že se významně liší uvádíte na str. 13, ale mimo substrátové specifity a exprese se vic nedozvíme), což se mi zdá důležité vzhledem k tomu, že v experimentální části pracujete s čistými enzymy a nikoliv se synapsí
- str. 17 - při klasifikaci inhibitorů cholinestras mi připada zbytečné uvádět klasifikaci pesticidů, když samotné inhibitory moc neklasifikujete, postrádám třeba zmínku o přítomnosti v bojových látkách (uvedeno až později). Fysostigmin rozhodně nepochází z fazole, ale z puchyřnatce jedovatého. Calabar bean uvedený ve zdroji 8 je kalabarský bob, což je semeno puchyřnatce
- str. 18-22 - vzhledem k zaměření práce se mi zdá zbytečné dlouhá část inhibitory cholinestras, kde podrobně popisujete jednotlivé látky. Ale i přesto zde zcela chybí uvedení NIMP, NEMP, POX, NEDPA, které pak používáte v experimentální části. Navíc tato celá část používá prakticky jediný zdroj, zdroj 8.

- str. 23 - v části inhibitory cholinestras jako farmakoterapeutika nemá co dělat memantin, protože je to inhibitor NMDA, což i tedy uvádíte, ale kapitola se nejmenuje terapie Alzheimerovy choroby
- str. 24-31 sekce reaktivace cholinestras velmi podrobně popisuje mechanismus reaktivace a jednotlivé struktury reaktivátorů. Vzhledem k zaměření práce (úroveň in vitro) se mi zdá skoro zbytečné se podbně zabývat dávkováním a inovacemi v léčbě
 - str. 32-35 se sice jmenuje imobilizace enzymů ale zabývá se pouze imobilizací cholinestras a používá prakticky jediný zdroj, zdroj 34, což je škoda, když na toto téma existuje celá řada publikací či knih a dal by se napsat pěkný kompilát. Vůbec autor nezmiňuje např. afinitní zakotvení, které i sám pak experimentálně používá (ale ve zdroj 34 se neuvádí)
- str. 38-39 kapitola ellmanův esej - termín esej bych zde ani jinde v práci rozhodně nepoužívala, v českém jazyce má esej jiný význam, jde o Ellmanovu metodu, Ellmanův test, stanovení dle Ellmana apod. Sdělení "přítomnost inhibitoru se projeví bílým zbarvením" není přesné, roztok zůstane bezbarvý nikoliv bílý
- str. 41-44 - experimentální část - bylo by vhodné metodiky lépe popsat, ujednotit použití koncentrací (c(zasobní), c(final), tak aby bylo zřejmé kolik čeho je v reakční směsi (např. 3.1.3.4 vyjádření o množství inhibitoru v reakční směsi 0,5 ul inhibitoru o c=25 uM/200 ul je dost nejednoznačné, není jasné jestli koncentrace reaktivátorů jsou zásobní nebo finální)
- str. 49-59 výsledky a diskuse - tabulky obsahují výsledky jednotlivých měření, což se obvykle v tomto typu práce neuvádí, pouze průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. Navíc díky tomu tabulky 8,9,10 velmi malé a v podstatě zbytečné. Navíc z každé tabulky vychází i graf, který v podstatě říká to samé. Popis i struktura tabulek je zavádějící, není zřejmé, co obsahují- např tabulka 2 "Absorbance pro magentické histrap částice" rozhodně nemůže obsahovat pouze absorbanci, ale pokud jde o aktivitu (což vyplývá z textu) musí to být aktivita vyjádřená jako změna absorbance za čas, což by mělo být i v popisu obrázku i v tabulce. Název tabulky by mohl být například "Aktivita AChE před a po imobilizaci na magnetické částice Histrap". Další tabulky trpí obdobnými problémy.
- str. 49-59 výsledky a diskuse. Vzhledem k tomu, že funkčnost navrženého konceptu nebyla dle představ bylo by možné docela dobře diskutovat či navrhopat možné důvody a řešení či porovnat výsledky se známými hodnotami, ale to se zde vyskytuje jen ve velmi omezené formě. Např. sdělení na 57 "Obecně lze konstatovat, že u imobilizovane AChE je účinnost reaktivace nižší ve srovnání s daty publikovanými i s naměřenými daty pro volný enzym" se mi jako plodná diskuse nezdá.
- str. 62-72 - literární zdroje - u článků v časopisech se neuvádí dostupné z a datum citace, samotná správná citace článku je dostatečnou charakteristikou zdroje. Zatímco u článku tyto informace máte (včetně datumu citace) u zdrojů z webu to mnohde chybí (např. [26], [60]), jinde zase články uvádíte jako weby (např. [13]). Literární zdroje také

nejdou citovány jednotně, někde chybí autoři (např. [12]), někde jsou uvedeny bez jména (např. [38]), někde jsou názvy článku uvedeny malým, jinde velkým písmem a další chyby. Zdroj [2], což je středoškolská učebnice nepovažují za zdroj vhodný pro diplomovou práci.

Otázky:

- v práci jste používal dva enzymy ze skupiny cholinestras, zařadte je a uveďte jejich označení v názvosloví enzymů.
- na str. 14 uvádíte, že biologickou rolí AchE je ukončení přenosů na cholinergních synapsích. Jakým způsobem se dostane AchE do synaptické šterbiny? Jaká je role AchE v červených krvinkách?
- na str. 26 uvádíte, že intoxikace somanem je léčitelná otrava, stejně tak jako intoxikace látkou VX ačkoliv na str. 25 uvádíte velmi odlišné časy stárnutí enzymu. Upřesněte a vysvětlete proč?
- na str. 34 uvádíte, že imobilizací se může zvýšit aktivita enzymu a snížit jeho K_m . Vysvětlete proč tomu tak je?
- na str. 35-36 popisujete stanovení aktivity cholinestras podle Ellmana, ale správně uvádíte, že existují i jiné metody stanovení. Popište a vysvětlete metodu elektrometrickou a titrační.
- v práci chybí přesný popis použitých stacionárních fází, což je problematické, zejména pokud jsou v centru pozornosti celé práce, sdělení magnetické stacionární fáze His-Trap (Thermo Fisher's Scientific) a SIMAG-PGL(Thermo Fisher's Scientific) či nemagnetické stacionární fáze Sepharosa (Thermo Fisher's Scientific) rozhodně nestačí, navíc simag-PGL rozhodně nejsou od Thermo. Uveďte přesně jaké částice šlo včetně jejich velikostí.
- na str. 41 v seznamu chemikálií zcela chybí použité inhibitory NIMP, NEMP, POX, NEDPA či nemagnetické His-Trap částice. Popište o jaké látky jde a vysvětlete proč se používaly i přesto, že o nich nepíšete v sekci inhibitory cholinestras. Doplněte jaké nemagnetické histrap částice se používali včetně jejich velikosti a jaké množství se používalo pro vazbu.
- na str. 42 je postup imobilizace AChE na různé částice, porovnejte množství použitých částic pro vazbu (není zřejmé, z použitých c (zásobní), c (final)). Jaká je kapacita částic? Porovnejte s množstvím použité AchE. Nebylo by vhodné částice blokovat?
- na str. 46 uvádíte, že aktivita imobilizovaného enzymu je 2,6x vyšší. Jak si to vysvětlujete? Proč je výsledek 1. měření u volného enzymu (tab. 2) zcela odlišný? Pochybuji, že směrodatná odchylka výsledku pro volný enzym je 0,013. Jaký byl použit kontrolní vzorek pro měření aktivity? Jak si vysvětlujete, že imobilizace AchE u ostatních částic nevedla ke zvýšení/zachování aktivity? Bylo nějak prokázáno skutečné zachycení enzymu na částicích (byť v neaktivní formě)? Jak byste to mohl provést?
- jak si vysvětlujete, že aktivita volného enzymu je při jednotlivých měření odlišná (tabulka 2-5, hodnoty v rozmezí 0,420 - 1,112). Též aktivita imobilizovaného enzymu se

v různých tabulkách liší (Tab.2 a Tab. 6 a 7). Vzhledem k úrovni popisu výsledků nelze dohledat, zda by mělo jít o identické hodnoty. Prosím vysvětlete.

- na str. 52 používáte imobilizovanou BuChE. Byla provedena také optimalizace imobilizace nebo se použily pouze podmínky stanovení pro AChE. Lišilo se nějak množství imobilizované BuChE?

- v experimentální části zcela chybí zásadní informace o použitých enzimech mimo sdělení původu (katedra PŘF, Hradec Králové). O jaké enzymy šlo? Šlo o enzymy plné délky či jen fragmenty? Kde byl lokalizován histag?

- na str. 57 uvádíte "Obecně lze konstatovat, že u imobilizované AChE je účinnost reaktivace nižší ve srovnání s daty publikovanými i s naměřenými daty (tabulka 10) pro volný enzym". Porovnejte vámi získané hodnoty a hodnoty publikované (vyberte si např. jeden inhibitor a různé reaktivátory)? Lze to jednoduše porovnávat?

- navrhněte proč reaktivace na imobilizovaných enzimech nefungovala dle vašich představ (delší vyjádření 3 řádky než na straně 58) a navrhněte jak by bylo například možné postup/přístup modifikovat pro zlepšení?

Výsledné hodnocení:

vyberte hodnocení

V Hradci Králové dne 28.7.2020

Podpis vyberte