

Posudek oponenta doktorské práce

Student: Mgr. Katarína Vorčáková

Školitel: prof. Ing. Karel Vytrás, DrSc.

Školitel specialista: Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

Název práce: Biosenzory a ďalšie metódy pre detekciu inhibítorov cholinesteráz

Obor: Analytická chemie

Pracoviště studenta: Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Předložená doktorská práce má strukturu standardně pojaté výzkumné zprávy obsahující uvedení do problematiky, metodiku i výsledky spojené s diskuzí. Jak úvod práce, tak i diskuze výsledků se odkazuje na aktuální články z oboru. Vlastní text doktorské práce je sepsán čtivě, na dobré odborné i stylistické úrovni za využití platné odborné terminologie. V závěru práce (kapitola 6) je shrnuta publikační činnost Mgr. Kataríny Vorčákové. Jedná se o tři přijaté publikace v časopisech s IF a řadu dalších ve sbornících a časopisech bez IF. Jiné tři články procházejí recenzní řízením v časopisech s IF. Po samostatném prostudování v seznamu uvedených vyšlých článků s IF mohou konstatovat, že se jedná o kvalitní publikace v prestižních časopisech. Zde zveřejněné výsledky prošly úspěšně samostatným recenzním řízením a nacházejí odezvu ve vědecké komunitě, o čemž například svědčí šest citací u práce otištěné v *Bioorganic and Medicinal Chemistry* v roce 2013.

K disertační práci nemám zásadní připomínky, ale na druhou stranu některé části vyžadují komentáře recenzenta:

- Kapitola 2.1.2.2: „Meraný prúd je priamo úmerný koncentrácii stanovovanej látky“ – s tímto tvrzením týkajícím se amperometrickým biosenzorům lze ve většině případů souhlasit, ale právě diskutované biosenzory s vázanou AChE fungují přesně opačně. Analyt (inhibitor) způsobí pokles stanovovaného signálu (proudu). Jedná se tedy o nepřímou úměru.
- Kapitola 3.3.3: „Použité elektrochemické senzory boli zakúpené od firmy BVT Brno (ČR) a PalmSens (NL)“. Doporučuji být v případě popisu senzorů konkrétnější, aby byla zajištěna reprodukovatelnost postupů. BVT je jak prodejce, tak i výrobce senzorů a z fotografie (senzory 2 a 3) lze odvodit o jaké výrobky se jednalo. U PalmSens je situace poněkud složitější. Tato společnost se zabývá především vývojem a výrobou analyzátorů a pouze distribuuje senzory jiných výrobců. Senzory číslo 1 a 3 jsou produkty německé společnosti BST Bio Sensor Technology GmbH a nikoliv zmíněné PalmSens.
- Kapitola 4.5: při uvádění nalezených interakcí v tabulkách doporučuji uvádět i vazebnou energii spočítanou pomocí popsaného molekulárního modelování.

Ke studentce mám následující dotazy:

- Na straně 25 uvádíte existenci periferního anionického místa (v literatuře označováno též β anionické a tvoří jednu část s tzv. aromatickým hrdlem) a popisujete důležité

aminokyseliny, které je tvoří. Jaký je fyziologický význam periferního anionického místa AChE?

- Ačkoliv AChE i BChE jsou si vzájemně velmi podobné, jsou mezi nimi i některé významné rozdíly. Například je zde zásadní rozdíl v konverzi substrátu vyskytujícího se v nadbytku. Dokážete tento problém rozvést?
- V kapitole 2.4.2.3 a v kapitole 2.5.3 představujete ireverzibilní inhibitory zastoupené organofosfáty. Jak správně uvádíte, inhibovaný enzym trvale ztrácí schopnost reagovat se substrátem. Je takto vázaný organofosfát stabilním reziduem v aktivním centru, nebo může projít další přeměnou?

V závěru svého posudku mohu konstatovat, že předložená práce splňuje všechny náležitosti na doktorské práce kladené a tematicky odpovídá zadání. Práce je zdařilá a opírá se o kvalitní sdělení v odborných periodících. Výše uvedené výhrady mají charakter jen drobných připomínek a nesnižují celkovou vysokou úroveň doktorské práce. Na základě výše uvedeného **DOPORUČUJI** disertační práci přijmout k obhajobě a po úspěšném obhájení udělit Mgr. Kataríně Vorčákové titul Ph.D.

.....
pplk. doc. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D., DSc
Fakulta vojenského zdravotnictví
Univerzita obrany v Brně
Třebešská 1575, 50001 Hradec Králové
e-mail:
miroslav.pohanka@gmail.com

OPONENTSKÝ POSUDEK

na disertační práci

Téma práce:

**BIOSENZORY A ĎALŠIE METÓDY PRE DETEKCIU INHIBÍTOROV
CHOLINESTERÁZ**

Autor:

Ing. Katarína Vorčáková

Školitel:

prof. Ing. Karel VYTRÁS, DrSc, Univerzita Pardubice

Oponent:

doc. Ing. Josef KELLNER, CSc. UO Brno

Oponovaná disertační práce je sepsána na 136 stranách a obsahuje množství náročně sepisovaného textu, grafů tabulek a chemických strukturních vzorců. Práce je členěna obvyklým způsobem na kapitoly: Úvod, Teoretická část, Experimentální část, Výsledky a diskuze a Závěr. Cíle práce jsou uvedeny v souhrnu a úvodu práce. Z nich vyplývá, že doktorandka měla za cíl posoudit možnosti aplikace metod založených na elektrochemickém principu s využitím square-wave voltametrie pro zjištění inhibiční účinnosti testovaných látek, vhodných pro terapii Alzheimerovy choroby a autoimunitního onemocnění Myasthenia gravis.

Kapitola „Teoretická část“ popisuje současný stav poznání v oblastech cholinesterázových biosenzorů s důrazem na elektrochemické biosenzory. Pozornost zde je dále věnována imobilizačním technikám zakotvení cholinesteráz na povrchu pracovních elektrod a jejich dopadům na enzymovou kinetiku, tj. Michaelisovu konstantu a maximální rychlost hydrolýzy substrátu. Tato problematika je v práci podrobně diskutována zejména v souvislosti se stanovením inhibiční účinnosti vybraných, zejména karbamátových inhibitorů acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy.

Nejdůležitější částí práce je Experimentální část a kapitola Výsledky a diskuze, která popisuje způsoby realizace jednotlivých typů experimentů, dosažených výsledků práce, kdy bylo testováno celkem 253 inhibitorů, vybraných cestou molekulového modelování s využitím vybraných počítačových programů.

Lze konstatovat, že formální požadavky na disertační práci byly splněny. Také cíle stanovené pro disertační práci byly splněny. Je zde patrný přínos studenta zejména v realizaci a vyhodnocení realizovaných experimentů. Pro lepší pochopení výsledků experimentů by bylo dobré zdůvodnění závěrů práce popsat podrobněji. Mám na mysli váš závěr, že pro testování inhibiční účinnosti nových inhibitorů je vhodnější využití Ellmanovy metody, než metod elektrochemických.

K úpravě práce nelze mít zásadních připomínek. Výstupy jsou ilustrovány pomocí tabulek a grafů s úplným popisem, text je přehledně členěn. Také z jazykového hlediska není práci co vytknout. Práce je opatřena úplným seznamem použitých zkratk. Snad by bylo vhodné práci doplnit ještě seznamem grafů, tabulek a vzorců.

Doktorandka dosud publikovala 8 prací vztahujících se k tématu disertační práce, z toho tři práce v časopisech s impaktovým faktorem, dvě publikace v zahraničních recenzovaných časopisech a dvě práce prezentovala na konferencích. K publikaci byly odeslané ještě další 3 publikace. Z tohoto pohledu lze konstatovat, že publikační aktivita autorky je na dobré úrovni.

Po prostudování předložené disertační práce konstatuji, že předložená disertační práce svým cíleným zaměřením, obsahem i rozsahem, představuje kvalitní zpracování problematiky aplikace biosenzorů při testování koncentračního rozmezí, časové stability a stanovení inhibiční účinnosti vybraných inhibitorů. Vzhledem k zaměření práce lze konstatovat, že výsledky práce jsou prakticky aplikovatelné ve zdravotnictví a s ohledem na tuto skutečnost považuji téma disertační práce za velmi aktuální.

Ke zvolenému postupu zpracování disertační práce nemám připomínky, považuji ho za metodologicky správný, v části teoretické i praktické vyvážený a logicky provázaný. Přínos doktorandky je možno spatřit ve velmi kvalitně zpracované teoretické části disertační práce, z čehož vyplynula správná orientace doktorandky v řešené problematice a formulaci reálných cílů, které se jí podařilo naplnit.

Předložená disertační práce splňuje po formální stránce všechny požadavky kladené na práci tohoto typu. Je správně členěna, citace na použitou literaturu odpovídají normě ČSN ISO 690, rozsah a aktuálnost použitých literárních zdrojů je přiměřená.

Navrhuji, aby při obhajobě disertační práce doktorandka blíže vysvětlila své stanovisko k těmto otázkám:

- 1) Jak si vysvětlujete, že funkční se ukázal pouze jeden ze čtyř tištěných elektrod. V čem se testované elektrody liší?

- 2) Proč byla ze všech elektrochemických testována pouze technika square-wave voltametrie (SWV)?
- 3) V práci uvádíte, že měření inhibičních vlastností s využitím Ellmanovy metody a SWV vykazovalo značné rozdíly. Jak je možno vysvětlit zcela rozdílné výsledky uváděné např. v tabulkách 3 až 5, kde naměřené hodnoty pro butyrylcholinesterázu jsou téměř srovnatelné s Elmanovou metodou, na rozdíl od acetylcholinesterázy, která vykazuje řádově rozdílné výsledky?
- 4) Jaký byl LOD a LOQ testovaných inhibitorů?
- 5) Odkud byly získány využití programy pro molekulové modelování a jak se jednotlivé programy liší?

Závěr

Konstatuji, že disertantka v předložené doktorské disertační práci prokázala potřebnou schopnost a připravenost k samostatné vědecké a výzkumné práci.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji přijetí práce k obhajobě a po úspěšném obhájení této práce udělení akademického titulu Ph.D.

V Brně dne 23. října 2015

doc. Ing. Josef Kellner, CSc.



POSUDEK OPONENTA DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE

„Biosenzory a další metody pro detekci inhibitorů cholinesteráz“

Autor: Mgr. Katarína Vorčáková

Školitel: prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.

Školitel specialista: Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

Oponent: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Mgr. Katarína Vorčáková předložila k obhajobě disertační práci na téma „Biosenzory a další metody pro detekci inhibitorů cholinesteráz“.

Práce, která je psána ve slovenském jazyce, představuje 136 stran vlastní práce a seznam literatury, který čítá 129 položek. Práce se mj. opírá o autorčiny publikace, v časopisech s IF (Bioorganic & Medicinal Chemistry IF = 2,921, Molecules IF 2,095 a další). Publikované práce a práce předložené představují dobrou úroveň dosažených výsledků.

Vlastní práce je členěna do obvyklých kapitol, ale po úvodu chybí kapitola, ve které by byly jasně definovány cíle. Čtenář musí v průběhu práce dedukovat, proč byly všechny experimenty prováděny a k čemu dosažené výsledky mají sloužit.

V teoretické části se autorka soustředila na problematiku biosenzorů, jejich využití při testování cholinesterázových aktivit a neurodegenerativních chorob, v jejichž terapii se využívají inhibitory cholinesteráz (ChE). Vzhledem k závažnosti Alzheimerovy choroby (AD) v dnešní době, mohla být tato problematika rozpracována podrobněji. V textu je uveden přehled hypotéz vzniku tohoto závažného onemocnění. U těchto hypotéz však postrádám uvedení rámcové možnosti terapeutického zásahu do popsaných patofyziologických procesů. Můžete tyto možné zásahy v rámci diskuze přiblížit a s tím i nové směry ve výzkumu potenciálně využitelných látek v terapii AD? Neztotožňuji se zcela s přehledem používaných léčiv v terapii AD. Některá ze zmíněných léčiv se již z různých důvodů nepoužívají nebo ještě nebyly schváleny a jsou teprve ve fázi klinického testování. Není mi úplně jasné zařazení kapitoly „2.5.3 Nervovo paralytické látky“, resp. Role těchto látek snad ve farmakoterapii? Jsem přesvědčena, že se jedná o jiné téma.

V kapitole Výsledky a diskuze autorka shrnuje celou řadu výsledků, které svědčí o množství odvedené práce. První část výsledků, které se týkají práce s biosenzory, optimalizace měření s biosenzory atd., je diskutována v kontextu dříve publikovaných prací a vede k jasnému závěru o možné vhodnosti či nevhodnosti použití biosenzorů při testování inhibitorů cholinesteráz. Druhá, rozsáhlejší výsledková část je z mého pohledu pojata spíše jako určité shrnutí dosažených výsledků. V rámci diskuze jsou z jednotlivých skupin látek vždy zmíněny sloučeniny s nejvyšší aktivitou vůči acetylcholinesteráze (AChE) a butyrylcholinesteráze (BuChE), není diskutován vztah struktury vs. biologické aktivity. K této diskusi přímo vybízí např. skupina testovaných derivátů karbamátů a thiokarbamátů, kde bylo sledováno 63 různých látek. Dále jsem v diskusi nenašla informaci, zda podobné sloučeniny byly již dříve testovány nebo ne. U výsledků inhibičních aktivit postrádám informace o aktivitách použitých

standardů. Získané hodnoty IC_{50} testovaných látek není možné porovnat s hodnotami IC_{50} známých inhibitorů a získaná data tak nemají vypovídací hodnotu, zda určitá látka má reálný potenciál v dalším studiu možnosti využití jako inhibitoru ChE.

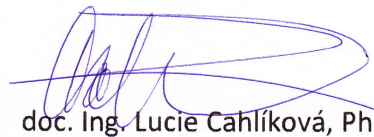
V závěru práce autorka shrnuje práci, kterou provedla. Disertační práci uzavírá seznam publikovaných prací. Publikační aktivita autorky je dostačující, ale postrádám prvoautorskou práci v časopise s IF, která by byla v době konání obhajoby alespoň ve stavu „accepted“. Dvě prvoautorské práce jsou uvedeny v přehledu odeslaných prací do redakce; v jakém stadiu oponentního řízení tyto práce jsou?

V rámci diskuze předkládám dále následující dotazy:

1. Jaké byly použity pozitivní standardy v případě měření ChE aktivit? Jaké hodnoty IC_{50} jste získala? Porovnejte je s hodnotami uváděnými v literatuře a s hodnotami, které máte uvedeny ve vašich publikovaných článcích s IF.
2. V teoretické části se věnujete problematice typu inhibice, v experimentální a výsledkové části jsem nenašla informaci o tomto testování. Proč nebyl testován typ inhibice alespoň u neaktivnějších inhibitorů z každé skupiny sloučenin? Budou se tyto studie provádět při dalším pokračování Vaší práce?
3. Které terapeutické cíle jsou v dnešní době nejzajímavější z pohledu potenciálního využití v terapii AD?

Výše uvedené připomínky nesnižují faktickou náplň předložené studie, dotazy pramení ze skutečnosti, že se v rámci své vědecké práce zabývám podobnou tematikou a práce mě tedy zaujala. Připomínky mohou být i určitým návodem pro kandidátku do případné další vědecké práce. Předložená doktorská disertační práce splňuje požadavky, které jsou kladeny na tento typ kvalifikačních prací a proto ji v souladu s § 47 zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů doporučuji k přijetí a obhájení. Po úspěšné obhajobě souhlasím s udělením akademického titulu Ph.D. („Doktor“).

V Hradci Králové dne 15. 10. 2015


doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.
Farmaceutická fakulta, Hradec Králové
Katedra farmaceutické botaniky a ekologie
Heyrovského 1203
500 05, Hradec Králové
Tel. + 420 495 067 311
Mob. + 420 731 134 983
e-mail: cahlikova@faf.cuni.cz