

OPONENTSKÝ POSUDEK DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno studenta: **Bc. Veronika CHLÁDKOVÁ**

Oponent: **RNDr. Lucie KORECKÁ, Ph.D.**

Předložená diplomová práce studentky Veroniky Chládkové je součástí výzkumu skupiny biochemie na KBBV a je zaměřena na možnosti elektrochemické detekce inhibitorů acetylcholinesterázy s využitím tištěných dvou nebo tříelektrodových senzorů, které umožňují analýzu v malém množství vzorku. V rámci práce byly testovány inhibitory připravené na Ústavu organické chemie a technologie, FCHT, UPCE.

V teoretické části studentka popisuje strukturu enzymů acetylcholinesterázy a butyrylcholinesterázy, dále se zabývá základním strukturou a rozdělením biosenzorů a teorie je doplněna o konkrétní příklady aplikací biosenzorů pro detekci inhibitorů výše zmíněných enzymů.

Experimentální část popisuje jednotlivé postupy měření, kdy vedle elektrochemické detekce, která byla zaváděna, byla logicky provedena i spektrofotometrická detekce jako metoda která je již zavedena, optimalizovaná a slouží jednak pro potvrzení účinků inhibitorů a také pro porovnání s detekcí elektrochemickou.

Výsledková a diskusní část obsahuje výsledky uspořádané výstižně do tabulek a grafů, co do komentářů a vlastní diskuse výsledků je značně strohá.

Ke všem částem práce mám řadu připomínek, a to nejen formálních, ale hlavně věcných, které dle mého názoru značně snižují kvalitu předkládané diplomové práce.

Formální připomínky:

Souhrn (i Summary) by měl být umístěn před obsahem, v případě, jak je tomu u této práce, by musel být uveden v obsahu a číslován. Stejně tak je nestandardní členění obsahu (teoretická část a experimentální samostatně uvedeny s velkým nadpisem, výsledky nikoliv), nesjednocený je formát a typ písma. Některé zkratky nejsou vysvětleny při jejich prvním použití v textu, za některými odstavci chybí uvedení citace. Práce obsahuje řadu překlepů (str. 12, 19 a další) a hrubých chyb (stanovení Michaelisovi konstanty, použití Ellmanovi metody). V případě enzymové aktivity jsou v textu využívány tři způsoby, a to U, IU a UI, mělo by být sjednocené.

Další připomínkou k formálním náležitostem práce mám k literatuře. Pro práci autorka použila 32 citací českých či zahraničních zdrojů, odborných článků, ale i internetových odkazů, z nichž některé (www.encyclo.co.uk či www.peta.unas.cz) nejsou vhodné pro vědecký text. Počet 32 odpovídá dle mého názoru spíše bakalářské práci než diplomové. To platí i pro celkový rozsah práce, která obsahuje pouze 46 stran odborného textu, zbytek do celkových 60 jsou formální náležitosti a seznam literatury.

Věcné připomínky:

Teoretická část:

- Celá část o biosenzorech (7 stran) dle mého názoru nemá povahu odborné rešerše, kterou má být, pro zpracování bylo použito pouze 9 literárních zdrojů, z toho valná většina textu z odkazu www.peta.unas.cz. Na toto téma existuje nepřeberné množství vědeckých článků, navíc pouze jedna citace je z roku 2011, ostatní staršího data.
- Str. 11 kap. 2.1.1 - má název Enzymové biosenzory. Toto spojení se vyskytuje pouze v první větě, zbytek kapitoly pojednává obecně o enzymech.
- Str. 17 a 18 – u detekčních technik (cyklická volumetrie, square wave) jsou z jedné práce vytažené podmínky nastavení, které však jsou odlišné a je třeba je vždy optimalizovat pro danou aplikaci. Vhodnější by bylo porovnat nastavení z různých prací a tak, aby se vztahovala ke stejnému typu analýz, pak by to bylo opodstatněné v rámci rešerše.
- Str. 23 kap. 2.4. – má název biosenzory pro detekci inhibitorů ACHE, půl strany je však o biosenzorech jako takových, což bylo náplní kapitoly 2, pak by ale kapitola měla rozsah jedné strany A4. Konkrétních příkladů a aplikací z literatury je opět minimum, přestože citací lze nalézt velké množství.
- Str. 24 – ve schématech se vyskytují zkratky, které v okolním textu nejsou vysvětleny.

- Str. 24 – poslední odstavec – autorka zmiňuje použití mediátorů ve spojení s biosenzory. Téma není více rozpracováno, přestože mediátory jsou hodně využívány. **Prosím studentku o vysvětlení principu fungování takových látek.**
- **Dále prosím studentku o vysvětlení pojmu „senzory se zprostředkovanou detekcí“** (str. 24 poslední věta)
- Str. 25 kap. 2.4.1 – název podmínky stanovení – je uvedena opět pouze jedna práce, což neodpovídá rešerši
- Str. 27, 28 a 29 kap. o imobilizacích enzymů na povrch senzorů – z literatury jsou uváděny postupy provedení imobilizací, u jednotlivých reagensů jsou však mnohem důležitější koncentrace daných látek než objemy roztoků bez uvedení koncentrací
- Str. 27 – při imobilizacích je využíváno přidavku BSA při vlastní vazbě enzymu. **Dovedete vysvětlit proč?**

Experimentální část:

- Str. 32 – kapitola o použité laboratorní technice neobsahuje standardně uváděné informace o přístrojích a pomůckách (typ spektrofotometru, výrobce), zejména u elektrochemických senzorů by tato informace měla být uvedena
- Str. 32 kap. 3.2 – u přípravy roztoku enzymu je uvedeno, že bylo naváženo přibližně 10 mg – to nepovažuji za přesnou informaci
- Při uvádění jednotlivých metod je před vlastním postupem uveden princip či teorie k dané metodě. Dle mého názoru by toto patřilo spíše do výsledkové části
- V některých metodikách chybí jednotky (frekvence) či koncentrace použitých roztoků
- Str. 40 kap. 3.8.3 – **jak přesně bylo provedeno vyhodnocení plochy pod křivkou při elektrochemické detekci?**
- Str. 40 – na konci zřejmě chybí část textu na konci kapitoly 3.8.4 – je uvedeno pouze A a nic dalšího

Výsledky a diskuze:

Výsledková část je zpracována ve formě tabulek a grafů. Obsahuje však pouze strohá konstatování, která jsou na první pohled patrná z uvedených tabulek. Uvádím pouze namátkou:

- k tab. 3 - 6, str. 42, 43 „Výsledky získané po měření s jednotlivými senzory se mezi sebou liší, výrazné rozdíly jsou patrné především u mezní rychlosti, která se liší v jednotlivých případech významně“. Není uvedeno ani zamyšlení, čím to může být způsobeno. Ani oddělená diskuzní část nedává odpověď, ale pouze okopírovaný text: „Výsledky získané po měření s jednotlivými senzory se mezi sebou liší, výrazné rozdíly jsou patrné především u mezní rychlosti, která se liší v jednotlivých případech významně“ (str. 54, poslední odstavec). Některé výsledky by bylo třeba více okomentovat či lépe diskutovat. Navíc diskuze je tedy naprosto zbytečná, vzhledem k tomu, že je jedná o pouhé okopírování celých odstavců z výsledkové části. Stejně je to i u ostatních výsledků.
- Str. 48 Určení typu inhibice – je uvedeno, jak bylo vyhodnocení provedeno a jen konstatováno o jaký typ se jedná. Při porovnání s „návodem na určení typu“ (str. 37, obr. 5) je patrné, že by měly být křivky vyhodnoceny i s hodnotou K_m a uvedením V_{max} a jejich poměru, aby bylo na první pohled zřejmé, že se opravdu jedná o akompetitivní typ inhibice. Tyto informace však v práci chybí.
- Str. 48 Určení stability enzymu po imobilizaci – uvádíte, že imobilizace na uhlíkové elektrody sorpcí (je jedno, kterou metodou) se nezdařila. V literatuře je však tento postup nejběžnější. Vzhledem k tomu, že v předložené práci dané informace chybí prosím o komentář v rámci obhajoby: **Máte nějaké vysvětlení, proč se imobilizace nezdařila? Postupovala jste na základě jedné z prací nebo postupy a podmínky určitým způsobem optimalizovala?** Je zvláštní, že na senzory s platinou, která je inertní, byla sorpce úspěšná. Očekávala bych v diskusi nějaký návrh na možný další postup, vylepšení, řešení apod.
- V rámci práce byly testovány inhibitory syntetizované na Ústavu organické chemie a technologie. Až na tabulku a vzorec v experimentální části nejsou o testovaných inhibitech

v celé práci žádné další informace. **Proč byly zvoleny právě tyto látky? Jedná se o látky, u kterých se očekává praktické využití jako pesticidů, tedy látek, se kterými se člověk může setkat a mohou tak mít vliv na naše zdraví? Nebo se jedná pouze o modelové látky?**

- Jak jsem již zmínila, diskuze v podobě, v jaké se v práci vyskytuje, je naprosto nadbytečná a nicneříkající. Až na výjimky se jedná se pouze o okopírované úseky z výsledkové části.
- Str. 55 předposlední odstavec – jako nejúčinnější inhibitor je uvedena látka s číslem 4, na straně 56 v závěru je však uvedeno, že nejúčinnějším inhibitorem je látka číslo 1. **Která z informací je tedy platná?**

Závěrem konstatuji, že množství a charakter nedostatků dle mého názoru značně snižuje kvalitu diplomové práce, přestože téma je velice zajímavé a aktuální. Práci po zodpovězení mých otázek **doporučuji k obhajobě** a vzhledem k faktu, že studentka splnila všechny body zadání diplomové práce, přestože o bodu „Optimalizovat podmínky elektrochemického stanovení koncentrace thiocholinu“ by se dalo hodně diskutovat, hodnotím známkou **velmi dobře – M.**

V Pardubicích 21.5.2012



RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.