

Posudek diplomové práce Bc. Ondřeje Hejnara s názvem

„Studium kinetiky a mechanismu inhibice cholinesteras inhibitory na bázi benzothiazolů“

Tato diplomová práce pojednává o kinetice a mechanismu *in vitro* neinhibované i inhibované hydrolýzy chloridu acetylcholinu (ACH) a jodidu acetylthiocholinu (ATCh) komerčními enzymovými preparáty acetylcholinesterasy z mořského úhoře (ACHE) a butyrylcholinesterasy z koňské krevní plasmy (BCHE) ve vodném prostředí, při teplotě 25°C, pH 8, počáteční koncentraci obou substrátů 4 mM a určité iontové síle (není uvedena). Jako inhibitory bylo testováno 12 benzothiazolových karbamátů.

Práce je vypracována pečlivě (našel jsem pouze 2 pravopisné chyby) a přehledně. V rozsáhlé úvodní část jsou nejen teoretické základy prováděných experimentů, ale i zajímavý popis neurodegenerativních chorob, které jsou nebo mohou souviset s testovanými inhibicemi. Experimentální práce jsou provedeny a vyhodnoceny velmi dobře, takže z uvedených výsledků je možno činit platné závěry. Domnívám se, že z těchto výsledků (po doplnění) by mohla vzniknout docela pěkná publikace do některého ze specializovaných odborných časopisů.

Moje následující poznámky a dotazy by k tomu mohly posloužit:

Str.14

Rovnice (2.2b): Rovnice Briggs-Haldane (BH) se od rovnice Michaelis-Mentenové (MM) liší tím, že koncentrace E a ES jsou pro BH po celou dobu reakce ve stacionárním stavu ($d[E]/dt = d[ES]/dt = 0$), zatímco MM předpokládá neustálou rovnováhu tvorby ES [$K = [ES]/([E] \cdot [S]) \Rightarrow K_M = k_{-1}/k_1$].

Rovnice (2.3) má být: $K_s = [E] \cdot [S]/[ES]$

Str.15

Graf $v([S])$ má **tři** části: na začátku platí $[S] \ll K_M$, a tedy $v = (V_M/K_M) \cdot [S]$, tj. reakce 1. řádu na $[S]$, tj. přímka se směrnici (V_M/K_M) – rovnice (2.4a) je špatně. Na konci platí $[S] \gg K_M$, a tedy $v = V_m$, tj. reakce 0. řádu na S , tj. rovnoběžka s osou $[S]$. Ale mezi těmito krajními možnostmi probíhá třetí, hlavní a křivková část závislosti $v([S])$, kdy platí $[S] \approx K_M$.

Otázka 1: Jaká je ve skutečnosti směrnice závislost $[P](t)$ pro případ $v = V_m$?

Str.19

Ve schématu 2.11 by měly být vyznačeny i produkty reakce $E + P$, např. ES(EP) a ESI(EPI)

Str.30

Na řádcích 5 a 6 se píše o α -, β - a γ - anionickém místě. Je třeba vysvětlit, co to je.

Na posledním řádku je odkaz na vztah 2.18 – kde je? Poslední předchozí je rovnice (2.12) na str. 19. Správně je asi (2.20), ale pak schází vztahy (2.13) až (2.19).

Str.31

Pravý (termodynamický) rozdělovací koeficient je definován jako poměr rovnovážných **termodynamických aktivit** dané látky ve dvou **nemísitelných** kapalinách při dané teplotě.

V reakčních podmínkách musí být nejen pH, ale i druh pufru, a dále iontová síla prostředí (tu jsem nikde nenašel).

Předposlední a poslední řádek: k_3 je ...určující rychlostní konstantou inhibice (nikoliv celé reakce).

Str. 45

1. věta: ...princip metody je založen na hydrolýze ATCh a BTCh za vzniku TCh.

Reakce mezi DTNB a TCh je složitější [viz Komers et al., Sci. Pap. Uni. Pardubice, series A, FCHT, 9 (2003) 89-96.] Probíhá podle stechiometrické rovnice



pravděpodobně systémem dvou následných konkurenčních reakcí s velmi rychlým druhým krokem. Naštěstí to na použití pro daný účel nemá vliv. Absorbance žlutého zbarvení je ale velmi citlivá na pH prostředí. **Otázka 3:** Proč asi?

Str.46

1.věta: Samotná [TNB] nemůže být aktivitou (daného enzymu). Zde aktivita znamená reakční rychlost hydrolyzy daného substrátu daným enzymovým preparátem za daných podmínek. V rovnici (3.5) platí dále $[\text{TNB}] \equiv [\text{TCH}]$. U symbolu A by mělo být 412 nm.

... koncentrace TCH v závislosti na čase [25] a z ní hodnoty aktivity enzymu.

Byla připravena reakční směs v objemu 2 ml (složení viz kap. 3.2.1.3)

.... dle rovnice (3.6) ? , ale to není žádná rovnice! Nutno vypsát podrobně, jak koeficienty vznikly.

Str.48

Kap.3.2.3: ... Galvanický článek skleněná elektroda -závislost koncentrace kyseliny octové na čase.

Str.49

Bylo by vhodné uvést zde společnou počáteční koncentraci všech substrátů 4 mM a alespoň přibližnou hodnotu iontové síly prostředí.

V kap.3 V Experimentální části schází popis simulace experimentálních kinetických dat daným kinetickým modelem pomocí programu GEPASI. **Otázka 4:** Jak program GEPASI pracuje?

Str.51

Otázka 5: Proč bylo nutno měřit každý den základní aktivitu enzymového preparátu šestkrát?

Str.52

Otázka 6: Proč není možné sledovat hydrolyzu ATCH pomocí pH-statů?

Tabulky 4.6 – 4.17: Uvažte, zda má smysl uvádět uvedené hodnoty na tolik desetinných míst. Doporučuji uvést do záhlaví alespoň první tabulky pokusné podmínky (teplotu, počáteční koncentraci substrátu, pH, aktivitu, iontovou sílu).

Str.58

Kap. 4.3: Schází (stručný) popis ověřování platnosti předpokládaného modelu kompetitivní nevratné inhibice pomocí GEPASI. **Otázka 8:** Jak byla provedena simulace experimentu uvedeným modelem?

3.řádek: Reakce ...

Předposlední řádek: Kompetitivní inhibice je ale ve schématu (2.7) vratná!

Str. 61

Tab. 4.14: **Otázka 9:** Co znamená písmeno N v tabulce?

Str.67:

Kap. 5, odst. 2: Uvedené výsledky, získané Ellmanovou a pH-statovou metodou nelze vůbec porovnávat, protože v každé z nich je použit jiný substrát. Porovnání by bylo možné např. po testování obou substrátů další nezávislou HPLC metodou, která umožňuje paralelní stanovení závislosti ACH (ATCH), CH (TCH) i kys. octové na čase. Domnívám se, že uvedený důvod proč nelze pH-statem sledovat hydrolyzu ATCH není správný – viz Otázka 6.

Kap. 5.1, odst. 2: **Otázka 10:** Z čeho usuzujete, že je hydrolyza ATCH rychlejší než ACH? Platí to pro oba enzymy?

V případě stanovení koncentrace enzymu jde spíše o odhad.

Str.68

Odst.1: Rovnice MM neplatí všude, viz Tab. 4.14, písmeno N a konec odst. 2.

Odst.2: Dochází k nevratnému vzniku, nikoliv rozpadu komplexu enzym-inhibitor.

Odst.4: O rychlosti inhibice vypovídá kvantitativně rychlostní konstanta k_3

Odst.6 (8): Podle (Na základě) pH-statové (Ellmanovy) metody byly účinnější inhibitory ...
Str.69

Odst.2: Před publikováním je nutno podrobněji vyšetřit, zda hodnota k_3 není nějak závislá na koncentraci inhibitoru. V kladném případě to znamená, že reakční mechanismus je složitější než předpokládaný.

Odst.3: Viz Str.67, kap.5. odst.2.

Kap.5.3, odst.2: Tvrzení, že „ACHE je **silně** inhibována látkami“ je poněkud přehnané.
Str.71

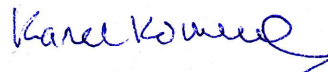
Odst.3: Spíše bych napsal: “Z výsledku měření plyne, že relativně účinnými inhibitory byly látky ...“

Do eventuelní publikace doporučuji psát ACh, ATCh, Ch a TCh místo ACH, ATCH, CH a TCH, neboť to recenzenti a redakce vyžadují.

Předložená diplomová práce je přínosem k výzkumu a hledání nových inhibitorů cholinesteras, které by mohly být základem lepších léků Alzheimerovy a příbuzných chorob. Práce je kvalitní a splňuje všechny požadavky kladené na tyto práce na Chemicko-technologické Fakultě Univerzity Pardubice. Proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím ji známkou

velmi dobře.

V Pardubicích 17. 05. 2012



prof. Ing. Karel Komers, CSc.