

Posudek oponenta k disertační práci

Student: Mgr. Markéta Kovářová

Název práce: Studium kinetiky inhibice cholinesteras

Studijní program: P1420 Fyzikální chemie

Obor: Fyzikální chemie

Disertační práce Mgr. Markéty Kovářové je zaměřena na problematiku cholinesteras a cholinergního systému. Hlavní pozornost je věnována inhibitorům potenciálně využitelných pro farmakologické účely. Práce je do jisté míry interdisciplinární, protože předkladatelka si musela osvojit znalosti fyzikální chemie, biochemie, analytické chemie a farmakologie. Její úsilí bylo úspěšně završeno přípravou sedmi rukopisů, z nichž tři jsou již otištěny v odborných periodících. Tento fakt ulehčuje práci oponenta, protože nosná část výsledků prošla samostatným recenzním řízením.

S ohledem na provedení vlastní disertační práce mohu konstatovat, že je psána na dobré stylistické i odborné úrovni. Svou náplní zcela odpovídá zadání a výzkumnému zaměření oboru. Studentka při řešení disertační práce zvládla řadu laboratorních postupů včetně stanovení aktivity cholinesteras spektrofotometricky, pH metricky, práci s kapalinovou chromatografií a statistické metody zpracování experimentálních dat. Užití postupy využila při charakterizaci nově připravených farmakologicky zajímavých inhibitorů cholinesteras. Při kontrole práce jsem nenarazil na zásadní nedostatky. Drobné připomínky bych měl k následujícímu:

- Zkratka pro ApoE gen není ideálně zvolená. Geny se v literatuře většinou označují kurzívou či jinak odlišují od proteinového produktu translace. Čtenáře může tato zkratka zmást a může se domnívat, že se jedná o vlastní apolipoprotein.
- Na str. 63, obrázku 2.17 a ještě dalších částech textu je zmiňováno pořadí aminokyselin v rámci primární sekvence AChE. Bylo by dobré v textu zdůrazňovat, pro jaký organizmus číslování platí.
- Obrázek 2.9. – popisem označen kumarin, ale znázorněná struktura je 7-MEOTA.
- Obrázek 2.2. – lepší by bylo volit označení amyloidní plak, než Alzheimerovský plak

- Str. 52 – upřesnil bych informaci, ohledně klinických studií zaměřených na huperzin – ve skutečnosti by měl být jako lék zaveden derivát ZT-1, což je proléčivo, z něhož huperzin vzniká až v trávicí soustavě pacienta.
- Str. 59 – bod 4 – vychytávání toxických látek – ano, BChE může vychytávat některé jedy (karbamátové inhibitory, organofosforové inhibitory), podílí se však i aktivně v detoxifikačním metabolismu (detoxifikační reakce I. fáze), kde odbourává například prokain, lidokain, suxamethonium a jiné. U zmíněných látek se nejedná o vychytávání, ale o hydrolytické odbourávání.

Na Mgr. Markétu Kovářovou mám následující formální dotaz:

Znáte laboratorní postupy, vhodné pro odlišení AChE a BChE založené na stanovení jejich aktivity?

Jsem rád, že na závěr svého posudku mohu konstatovat, že disertační práce Mgr. Markéty Kovářové je zdařilá. Zároveň splňuje všechny náležitosti na disertační práce kladené a tematicky odpovídá zadání. V předchozím textu zmíněné připomínky mají jen charakter drobných komentářů a nesnižují celkovou hodnotu disertační práce. Na základě výše uvedeného **DOPORUČUJI PŘIJMOUT** disertační práci k obhajobě ve stavu, v jakém byla předložena a po úspěšném obhájení udělit Mgr. Markétě Kovářové akademický titul Ph.D.

.....
pplk. doc. RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.

Fakulta vojenského zdravotnictví

Univerzita obrany v Brně

Třebešská 1575, 50001 Hradec Králové

e-mail:

miroslav.pohanka@gmail.com

Posudek oponenta disertační práce

Název práce: Studium kinetiky inhibice cholinesteras

Autor práce: Mgr. Markéta Kovářová

Vedoucí práce: Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

Oponent práce: doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Mgr. Markéta Kovářová předložila k obhajobě disertační práci s tématem „Studium kinetiky inhibice cholinesteras.“

Práce je psána v českém jazyce a má 170 stran v neobvyklém členění. Autorka práci rozdělila na Poznátky z literatury (47), Teoretickou část (13 stran), Experimentální část (27 stran) a Výsledky (26 stran). Autorka vytvořila Diskusi (15 stran) k experimentálním výsledkům práce a v Závěru (2 strany) celkový přehled o testovaných sloučeninách. Autorka cituje 170 literárních zdrojů.

Cíle práce jsou nejasně definovány a splývají s kapitolou Úvod, kde jsou popsány. Cíle práce se týkají sledování míry, kinetiky a mechanismu inhibičního působení 89 malých molekul *in vitro*.

V teoretické části (rozdělené na Poznátky z literatury a Teoretickou část) se autorka soustředila na Alzheimerovu chorobu, inhibitory cholinesteras, cholinesterasy a kinetiku hydrolyzy acetylcholinu pomocí acetylcholinesterasy. Nutno říci, že by bylo vhodné uspořádat teoretickou část logičtěji (např. cholinesterasy, inhibitory cholinesteras, kinetika hydrolyzy ... apod.). Teoretická část je také značně nevyvážená vzhledem k experimentálnímu zaměření práce, kdy některé podkapitoly (např. Alzheimerova choroba) jsou příliš rozsáhlé a nejsou pro zaměření práce esenciální. V části Poznátky z literatury se navíc nachází značné množství faktických chyb, nepřesných vyjádření a překlepů, které patrně plynou z použití nepříliš vhodné literatury (např. [16], [18], [34] ad.) namísto kvalitních up-to-date recenzovaných článků, kapitol a monografií.

Ve vlastní experimentální části se autorka zabývala stanovením kinetiky inhibice úhoří (eel AChE) a lidské acetylcholinesterasy (hAChE) pomocí dvou metod (pH statová vs. HPLC metoda), stanovení IC_{50} resp. pl_{50} pomocí 3 metod (Ellmanova, pH-statová a pH(t) metoda), rozdělovacího koeficientu a cytotoxicity vybraných sloučenin syntetizovaných na Univerzitě Pardubice, kdy popsala použité metodiky. V navazující části výsledky uvedla příklady (ukázky) jednotlivých použitých metod a souhrn výsledků.

Dle mého názoru by bylo vhodnější uvést ukázky použitých metod do části metodické a v části výsledky se zabývat pouze výsledky měření. Dále by bylo dobré zaměřit se na publikované standardy v prováděných metodikách, kdy by srovnání dvou vybraných metod mělo být validováno s obecně uznávanými metodikami (např. Di Pietro et al. Eur. J. Med. Chem. 2014, 73, 141; Wille et al. Chem.-Biol. Inter. 2013, 206, 569; Ronco et al. Bioorg. Med. Chem. 2009, 17, 4523; Sepsova et al. Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 16882; ad.). S tím také souvisí pracnost a možnost miniaturizace porovnávaných metod (viz. např. Worek et al. Drug Test. Anal. 2012, 4, 282; Holas et al. Expert Opin. Drug Discov. 2012, 7, 1207). U všech metod by také měl být použit porovnávací standard pro *in vitro* experimenty např. zmiňovaná používaná léčiva (částečně splněno v části diskuse, ale chybí zde donepezil), ale také experimentální standardy (např. BW284c51 ad.). U měřených veličin postrádám odchylky experimentálních měření. Tyto připomínky však nic nemění na faktu, že autorka provedla velké množství experimentální práce.

V části diskuse se autorka pokusila analyzovat výsledky měření k výběru optimálního inhibitoru, dále diskutovala testování optimálních inhibitorů na lidské AChE, vztahy mezi strukturou a

in vitro aktivitou testovaných sloučenin, cytotoxicitu optimálních inhibitorů a některé vypočítané vazebné energie.

Výběr optimálního inhibitoru byl založen na parametru N_{sum} , kde autorka sečetla hodnoty kinetických konstant pro 2 provedené metodiky, hodnotu pl_{50} a rozdělovací koeficient. Tento parametr se mi nezdá příliš vhodný, protože nebere v potaz rozdíly mezi kinetikou, silou inhibice a rozdělovacím koeficientem. Dle mého názoru by každá z naměřených veličin měla být posuzována zvlášť, nikoli jakou sumu číselných hodnot. Testování na hAChE spíše patří do části výsledky, zde by stálo za zvážení části výsledky a diskuse spojit, jak je tomu běžné v řadě odborných periodik. Hodnocení mezi strukturou a *in vitro* aktivitou testovaných sloučenin bylo opět provedeno na základě parametru N_{sum} , který může být zavádějící a nevyovídá o jednotlivých komponentech, z nichž byl vypočten.

V závěru práce autorka shrnuje provedenou práci. Dále uvádí seznam publikovaných a odeslaných prací. Autorka bohužel experimentální práci nepodložila kopiemi publikovaných prací, pouze jejich výčtem. Celkem byly publikovány 2 práce v impaktovaných časopisech, které však přímo nesouvisí se studovanou problematikou (Bioresource Technology - dle WOK Q1 v oborech Agricultural Engineering, Biotechnology & Applied Microbiology, Energy & Fuels) nebo jsou časopisy spíše průměrné kvality (Zeitschrift fur Naturforschung Section C - dle WOK Q4 v oborech Biochemistry & Molecular Biology, Pharmacology & Pharmacy). Jeden článek byl publikován v recenzovaném neimpaktovaném časopise (Current Enzyme Inhibition). Je zajímavé, že některé výše uvedené výtky k disertační práci jsou v publikovaných pracích vyřešeny (standards, odchylky měření apod.).

K předložené práci mám následující dotazy a shrnuji vybrané drobné nedostatky:

Dotazy:

1. Celá práce – V jakém software byly vytvořeny chemické vzorce/schématy (obrázky), které nejsou citovány (str. 65 a dále)? Jaké jsou vazebné úhly pro vazby atomů v hybridizaci sp^3 ?
2. Str. 21 – „jedinci, kteří vlastní gen ApoE- $\epsilon 2$ mají nízké riziko vzniku AD a ti, kteří zdědí jeden nebo dva geny ApoE- $\epsilon 4$, mají nižší pravděpodobnost vzniku AD. Vědci odhadují, že 40-60 % osob s diagnostikou AD má jednu nebo dvě kopie genu ApoE- $\epsilon 4$ “ – Jaký je tedy vztah ApoE- $\epsilon 4$ k AD?
3. Str. 22 – „Patogenetickým činitelem vzniku AD je zvýšené množství volných kyslíkových radikálů [15].“ – Jaká je patogeneze AD?
4. Str. 23 – „Diagnóza AD je podporována zvýšenou hladinou τ -proteinu a sníženou hladinou β -amyloidu, ale konečná diagnóza se stanovuje až *post mortem* [18].“ – Jaký je vztah β -amyloidu k AD? Kde je snížena jeho hladina?
5. Str. 32 – „Největší nárůst postižených osob je zaznamenán v rozvojových zemích, ve kterých žije nyní 57 % osob s demencí a v roce 2050 to bude 71 %.“ – Máte pro tento trend nějaké vysvětlení?
6. Str. 34 – Existují ještě další hypotézy vzniku AD (popř. jaké)?
7. Str. 35 – Nerozumím zařazení předposledního odstavce „Alzheimerova ...“ v kapitole 2.1.2?
8. Str. 39 – Takrin a 7-MEOTA přednostně odbourávají AChE před BChE? Donepezil - preferenční odbourávání AChE?
9. Str. 39 – Kapitola 2.1.2.3. – Existují také další používané inhibitory cholinesteras kromě vámi uvedených skupin?

10. Str. 41 – Dle vašeho názoru rivastigmin prostupuje v omezené míře do CNS. Jaký je jeho prostup, pokud jsou teoretické hodnoty (ACDLabs) ClogP 2.14, ClogD (pH 7.4) 0.93 a jeho C_{pKa} 8.89 (ChemAxon)? Lze prostup nějakým způsobem ovlivnit?
11. Str. 48 – Patří memantin do skupiny AChEI?
12. Str. 49 – Kapitola 2.1.2.5. – Jaký vztah mají MTDL k Alzheimerově nemoci?
13. Str. 80 – Jakým způsobem byla používána eel AChE připravená podle uvedené metodiky?
14. Str. 82 – Jakým způsobem byly upraveny standardy galantamin, rivastigmin a donepezil pro *in vitro* testování?
15. Str. 84 – Jaký byl celkový % podíl dioxanu v jednom *in vitro* experimentu?
16. Str. 91 – Jaké izomery chirálních sloučenin byly použity?
17. Str. 98 – Je možné uvedené metodiky pro měření kinetiky resp. IC₅₀ (pH-statová metoda) miniaturizovat?
18. Str. 100 – „Hodnoty IC₅₀ (pI₅₀) inhibitorů cholinesteras se běžně pohybují v intervalu od 0 do 1 μM (0 až 6).“ – Jakých hodnot IC₅₀ pro eel AChE nebo hAChE běžně dosahují používané inhibitory cholinesteras (např. donepezil)?
19. Str. 104 – Jak se v literatuře běžně označuje rozdělovací koeficient pro systém oktanol-voda a jaké jeho číselné hodnoty se nejběžněji uvádějí (viz. také Lipinsky rule of five)?
20. Str. 105 – „Pokud je hodnota IC₅₀ pro buňky vyšší než hodnota IC₅₀ pro enzym, lze látku použít jako potenciální léčivo, protože dávka, která dostatečně inhibuje enzym, není toxická.“ Je tomu opravdu tak? Nezáleží také na typu použitých buněk?
21. Str. 107 – Jaká krystalová struktura eel AChE byla použita pro molekulární docking?
22. Str. 123 – Jaký smysl má pro vyhodnocení výsledků parametr N_{sum}, kde se sčítají hodnoty rychlostní konstanty pro 2 rozdílné metodiky, hodnota pI₅₀ a K_{ow}? Je vhodné uvedené hodnoty sčítat do N_{sum}? Jaký smysl má průměr všech těchto hodnot v Tab. 5.2-5.7?
23. Str. 135 – Jaké parametry malé molekuly jsou důležité pro průnik bariérami včetně BBB (Lipinsky rule of five)?
24. Str. 136 – Jak si vysvětlujete rozdíly mezi IC₅₀ pro hAChE a eel AChE u sloučeniny 4T2?
25. Str. 146 – „Zkoumané dikarbamáty mají nižší inhibiční schopnost, ale jsou málo toxické a jejich toxicita s časem klesá.“ – Máte pro pokles toxicity nějaké vysvětlení?
26. Str. 147 – Jaký zámysl byl v korelaci výsledků ΔG-K_{ow}, ΔE-K_{ow}?

Vybrané drobné nedostatky (překlepů a nejasností je v textu více):

1. Množství překlepů a nesprávného frázování v textu.
2. Řada zkratk je z anglických nebo latinských termínů a tyto termíny by měly být vypsány, protože zkratka potom neodpovídá uvedenému českému překladu. Každá zkratka by měla být také uvedena v závorce při prvním použití v textu.
3. Str. 20 – „Tato porucha je způsobena umíráním prvních neuronů v té oblasti mozku, která se podílí na formování nové vzpomínky.“ – nevhodná formulace, počet neuronů ubývá s věkem v celém průběhu života.
4. Str. 21 – „Familiární agregace“ – nevhodné spojení.
5. Str. 25 – „Například snížené hladiny plasmatického β-amyloidu byly pozorovány při léčbě AD pomocí sloučenin inhibujících β- a γ-sekretasy, které štěpí APP.“ – nevhodná formulace.

6. Str. 33 – „Žádné z léčiv, která jsou v dnešní době dostupná k léčbě Alzheimerovy nemoci, nedokáže předejít smrti.“ – nevhodná formulace.
7. Str. 34 - První skupinu látek tvoří kognitiva, která představují inhibitory mozkových cholinesteras – acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy (BChE). – Kde se v organismu nachází většina BChE?
8. Str. 38 – Přejatý obrázek 2.5 obsahuje šestivazný fosfor, nesmyslně zakreslené substituenty nehledě a další nepřesnosti. Autorka v tomto případě mohla vytvořit obrázek vlastní.
9. Str. 38 „Před stárnutím enzymu může být AChE chráněna defosforylací serinového zbytku nukleofilem...“ – nevhodná formulace, stárnutí může být zabráněno nukleofilem, ale fosforylovaná AChE nemůže být chráněna nukleofilem.
10. Str. 39 – „Rozdělení inhibitorů cholinesteras podle chemické struktury - akridinové přípravky“ – nevhodná formulace.
11. Str. 39 – „Karbamáty - Na rozdíl od organofosfátů nejsou tak strukturně složité.“ – nevhodná formulace.
12. Str. 40 – „N-dimethyl deriváty“.
13. Str. 41 – „Tento aromatický heterocyklus (imidazol) je 1,3-diazol a je klasifikován jako alkaloid [67].“ – Dle mého názoru není imidazol přírodním alkaloidem.
14. Str. 61 ad. – „oxianionická díra“ – nevhodné spojení.
15. Str. 65 – Obr. 2.15 není po chemické stránce v pořádku (v textu je proces popsán správně).
16. Str. 66 – Obr. 2.17 by bylo vhodné překreslit pomocí vhodného chemického software.
17. Str. 85 – U Tab. 4.1. postrádám obecnou strukturu uvedených karbamátů.

Předložená disertační práce je přehledem o problematice řešené autorkou. Je škoda, že autorka se více nezabývala rešeršními činnostmi ve vztahu ke studované problematice, protože jinak by svou experimentální práci více přiblížila mezinárodně uznávaným metodikám a standardům. U předložené práce oceňuji velké množství experimentálních dat, i když i tyto by mohly být pečlivěji zpracovány a vyhodnoceny. Přes výše uvedené připomínky a nedostatky disertační práci v předložené podobě doporučuji k obhajobě.



doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.

Katedra chemie

Přírodovědecká fakulta

Univerzita Hradec Králové

Rokitanského 62

500 03 Hradec Králové

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci

Mgr. Markéty Kovářové:

„Studium kinetiky inhibice cholinesteras“

Autorka se v předložené disertační práci zabývá studiem kinetiky neinhibovaných a inhibovaných hydrolyz acetylcholinu a acetylthiocholinu pomocí acetylcholinesterasy, stanovením rozdělovacích koeficientů 89 substituovaných fenyلكarbamátů, 2-alkoxyfenylimidazolů a imidazolinů. U vysoce aktivních derivátů byla testována lidská acetylcholinesterasa a dále studována cytotoxicita na buněčné linii lidského karcinomu prsu. Práce rozšiřuje téma systematického studia inhibitorů acetylcholinesterasy, jako potencionálních léčiv Alzheimerovy choroby, řešené na Katedře fyzikální chemie Fakulty chemicko-technologické v Pardubicích. Z tohoto hlediska je nepochybné, že zadané téma disertační práce představuje velice aktuální a užitečný základní výzkum s vysokým aplikačním potenciálem. Práce obsahuje devět kapitol, které jsou odpovídajícího rozsahu a jsou logicky řazeny za sebou. Práce je zpracována přehledně na vysoké grafické úrovni. Formálně však postrádám explicitní a jasnou deklaraci cílů disertační práce, které vyplynou až z výsledků diskutovaných v závěrečné kapitole. K práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Bylo by vhodné uvést fyzikálně-chemické charakterizace testovaných karbamátů, případně odkaz, kde jsou tyto charakterizace prezentovány. Jedná se zejména o vyloučení tvorby solvátů, které by mohly zkreslit výsledky kinetických měření.
2. Jak byla ověřena chemická stabilita testovaných sloučenin v prostředích, ve kterých byla prováděna jednotlivá stanovení?

3. U pH-statové metody neutralizací uvolněné kyseliny octové vzniká octan draselný. Do jaké míry může při těchto experimentech docházet k ovlivnění rychlosti reakce změnou koncentrace reagujících složek a změnou iontové síly ?
4. Čím si vysvětlujete selhání Hammettových a Hansových substitučních konstant při korelaci s hodnotami k_3 , IC_{50} , K_{ow} a N_{sum} ?

Závěrem shrnuji: autorka odvedla solidní práci, prokázala tvůrčí přístup při řešení, provedla řadu měření s jejich náležitými interpretacemi. Z přiložených údajů vyplývá, že převážná část výsledků disertační práce prošla recenzním řízením a stala se předmětem 3 vědeckých prací uveřejněných v zahraničních impaktovaných časopisech a další 4 práce byly zaslány k uveřejnění. Disertantka prokázala schopnost samostatné vědecké práce. Z uvedených důvodů doporučuji přijmout předloženou disertační práci Mgr. Markéty Kovářové k obhajobě, jako podklad pro získání vědecké hodnosti Ph.D.

V Pardubicích 5. 6. 2014



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.