

“ Stanovení aktivity cholinesteráz v krvi “

Předložená diplomová práce řeší aktuální výzkumnou tematiku testování nových inhibitorů cholinesteráz za použití lidských krevních a plazmatických cholinesteráz. Studované karbamáty jsou perspektivní skupinou inhibitorů cholinesteráz s farmakologickou aplikací při léčbě Alzheimerovy choroby. Exelon® (rivastigmin) je prozatím jediným povoleným karbamátovým léčivem této choroby s celosvětovou aplikací.

Diplomantka prostudovala celkem 80 publikací a literárních studií převážně zahraničních, nebo v cizím jazyce a navázala na dřívější studie prováděné na katedře biologických a biochemických věd. FCHT. V teoretické části diplomantka popsala mechanismus inhibice cholinesteráz, fyziologii vzniku Alzheimerovy choroby i její současnou farmakoterapii. Dále popsala experimentální metodiky pro stanovení IC_{50} inhibitorů, konkrétní měření a výpočty. V této kvalitně zpracované teoretické části jsem našel chyby v Obr. 9 (str. 31) a to: Ve druhé rovnici působí činidlo H a v následujícím vzorci je trojvázný kyslík –OHR.

Dotaz 1: Je činidlo H atomární vodík, nebo něco jiného?

Dotaz 2: Jaký je chemický vzorec produktu reakce?

S tvrzením, že galantamin má fenanthrenový kruh nesouhlasím (str. 33, 1 ř. shora)..

Dotaz 3: Jaké kruhy galantamin obsahuje?

Experimentální část je rovněž kvalitně zpracována, ale i zde jsem našel chyby v názvech inhibitorů na str. 42 – 45, kde jsou halogenové substituenty chybně napsány, místo např. bromofenyl, chorofenyl má být bromfenyl, chlorfenyl atd. Diplomantka použila dvě nezávislé analytické metodiky, spektrofotometrickou (Ellmanovu) a pH-statovou a jejich výsledky porovnávala. Spektrofotometrická metoda poskytla hodnoty IC_{50} s nízkou směrodatnou odchylkou viz Tab. 4, zatímco u výsledků pH-statové metody v Tab. 5 směrodatná odchylka chybí. Mimo to jsou hodnoty IC_{50} této metody pro AChE 2 – 3 krát vyšší než u Ellmanovy metody a pro BChE jsou téměř neporovnatelné.

Dotaz 4: Proč v Tab. 5 nejsou směrodatné odchylky?

V diskusi diplomantka tyto rozdíly vysvětluje různými reakčními podmínkami, jinými substráty (acetylthiocholin versus acetylcholin), různými koncentracemi substrátů u obou metod (viz str. 66 poslední odstavec a str. 67 první odstavec), ale tyto své tvrzení nedokládá ani vlastními výsledky, ani citacemi z literatury. Opravuji dále tvrzení diplomantky uvedené na str. 66 na posledním řádku, že koncentrace substrátu byla u Ellmanovy metody 10 krát nižší než u pH-statové na správné tvrzení, že zmiňovaná konc. byla pouze 2 krát nižší (200 μ l 0,01 mol/l ATCh do 2 ml (str. 49, 11. ř. shora) a 300 μ l 0,1 mol/l ACh do 15 ml (str. 50, 8 ř. sh.)).

Pro vysvětlení rozdílných výsledků jsou pro mě rozhodující rozdíly v Michaelisově konstantě a v mezní rychlosti uvedené v Tab. 8 a Tab. 9 (str. 63 resp. str. 65) v řádcích s nulovou konc. inhibitoru, které dokazují, že konstantní charakteristiky enzymu jsou v obou metodách rozdílné a proto obě metody při tomto experimentálním uspořádání nemohou poskytovat shodné, příp. srovnatelné výsledky. Postrádám přílohy s primárními hodnotami a tabulkami všech výsledků, ze kterých by bylo možno provést podrobnější analýzu.

Dotaz 5: Jak by diplomantka upravila reakční podmínky, aby Michaelisova konstanta a mezní rychlost byly u obou metod stejné.

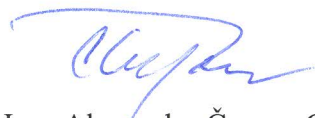
Je zřejmé, že diplomantka věnovala vypracování diplomové práce velké úsilí a získala řadu hodnotných výsledků, které dokazují, že diplomantka plně zvládla teorii i experimentální postup měření enzymatické reakční kinetiky včetně výpočtů inhibičních parametrů. Rozbor reakčního mechanismu inhibice u obou metod pak již přesahuje zadání diplomního úkolu, ale považoval jsem za nutné některá tvrzení opravit a nebo komentovat.

Doplnění údajů o studovaných inhibitorech rozdělovacím koeficientem v soustavě 1-oktanol/voda je důležité, protože dokazuje dobrou penetraci těchto sloučenin přes biologické membrány a tím i jejich případnou farmakologickou využitelnost.

Závěrem mého posudku konstatuji, že diplomantka splnila zadání diplomové práce ve všech bodech, předložila zprávu popisující teoretické a experimentální splnění zadaných úkolů, ke které jsem vyslovil výše uvedené připomínky. Doporučuji diplomovou práci Bc. Alice Hálové k obhajobě a hodnotím ji známkou:

velmi dobře

V Pardubicích 14.5.2015



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
oponent