

## OPONENTNÍ POSUDEK DOKTORSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE MGR. ADAMA KOSTELNÍKA

NÁZEV PRÁCE: Pokročilé analytické postupy využívající cholinesterasy

OPONENT: PharmDr. Ondřej Holas, Ph.D.  
Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Akademika Heyrovského 1203  
500 05 Hradec Králové

Předkládaná práce je multidisciplinárního charakteru. Zahrnuje práce s rekombinantními enzymy, konstrukci biosenzorů a molekulové modelování s cílem predikovat interakce potenciálních nových léčiv s jejich cílovou strukturou. Spojujícím prvkem práce jsou cholinesterasy, které jsou buď využity pro konstrukci biosenzorů nebo jsou potenciálními cílovými strukturami pro nové kandidáty léčiv. Takovýto rozsah témat je nadstandardní.

Teoretická část je zpracována přehledně a pokrývá problematiku klasifikace cholinesteras, jejich ligandů, možností jejich stanovení a patologických stavů, které jsou s nimi spojené. Je sepsaná přehledně, byť by mohla být na některých místech poněkud zpracována důkladněji. Literární zdroje jsou vybrány řádně, jsou dostatečně recentní a jsou v práci řádně citovány. V práci se na některých místech vyskytují poněkud vágní výrazy („doba separace se lehce prodloužila“). Jinak je práce po jazykové stránce naprosto v pořádku.

Praktická část je formulována jako komentovaný seznam publikovaných prací. Práce uvedené v předkládaném spisu jsou všechny publikovány v zahraničních periodických s IF (1,206-2,583) a doktorand je vždy prvním autorem, což není obvyklé a zaslouží si na tomto místě vyzvednout. Z množství provedených experimentů je zřejmé, že za touto prací je značné množství práce.

Doktorand je autorem nebo spoluautorem dvanácti prací v recenzovaných periodických souvisejících s předkládanou disertační prací. Toto dokazuje velmi nadprůměrnou úroveň vědecké práce v rámci řešení disertační práce.

K práci mám následující poznámky a dotazy:

- Seznam zkratk je naprosto nedostačující a v práci vyskytuje celá řada dalších zkratk, které nejsou v tomto seznamu uvedeny a některé nejsou ani vysvětleny (např. IA na straně 79).
- V práci se vyskytuje taxonomická nepřesnost, která se týká původu použité AChE *Torpedo Californica* není paúhoř elektrický (*Electrophorus electricus*), jak se v práci tvrdí, nýbrž pacifický parejnok. S ohledem na to, že se používá AChE obou těchto organismů, bylo by na místě toto opravit.
- Je indoxylacetát stejně vhodným substrátem pro AChE i pro BChE, nebo je jedním z enzymů preferován?
- V práci se vyskytuje rozpor v souvislosti s fyzikální sorpcí enzymu jako imobilizační metodou. Na str. 19 se uvádí, že je to metoda slibná a na téže stránce se dočteme, že není příliš vhodná s ohledem na vymývání enzymu. Lze tento rozpor nějak vysvětlit?

- Stárnutí enzymu inhibovaného organoforečnými inhibitory je v práci popisováno jako dealkylace, po které zůstává enzym fosforylovaný. To je i před procesem stárnutí, jaké je tedy hlavní nebezpečí spočívající ve stárnutí?
- Nesouhlasím s tvrzením na str. 21, že reaktivátory nukleofilně atakují elektronegativní kyslík komplexu-enzym-inhibitor.
- Takrin není diskutován jako léčivo Alzheimerovi choroby, jak je uvedeno na str. 23. Byl již před značnou dobou pro závažné nežádoucí účinky stažen z trhu.
- Na str. 25. se uvádí cholinergní teorie o vzniku a rozvoji Alzheimerovi choroby jako ta obecně přijímaná. Nicméně žádná další tu není zmíněna, jaké jsou ty další?
- Na str. 28 se uvádí, že organofosfáty se váží přednostně na BChE. Je to skutečně tak, lze to doložit nějakou publikovanou prací?
- V práci postrádám informace o tom, jakým způsobem došlo k vazbě mezi magnetickými částicemi a enzymem. Jedná se zejména o přílohy 1 a 2. Je to možné ilustrovat chemickou strukturou linkeru? K jaké jsou mechanismy vazby přes hydroxy, amino a imino skupinu zmíněné na str.45?
- Nesouhlasím s tvrzením, že krystalografickou strukturu proteinu lze získat elektronovou mikroskopií (str. 91).
- V práci se na str. 93 uvádí hodnota  $-7,84$  kcal/mol. Lze na základě této ovládnuté vazebné energie usuzovat něco o inhibičním potenciálu dané látky? Jaká byla hodnota volné vazebné energie původního (nebo jiného známého ligandu)?

#### Náměty do diskuse:

- Je žádoucí selektivní inhibice AChE pro terapii Alzheimerovi choroby, nebo jsou výhodnější látky s duálním efektem AChE/BChE?
- V práci je na několika místech popsán vliv organických rozpouštědel na aktivitu cholinesteras. Také se zde tvrdí, že lze jednoduše odečíst míru inhibice organickým rozpouštědlem a získáme reálnou představu o inhibičních vlastnostech analytu. Je možné, že v prostředí organických rozpouštědel se mění konformace molekul enzymu, a tedy i některé parametry měřené v této práci ( $K_i$ ,  $K_m$  apod)?
- Obecně nepovažuji za přínosné se vyjadřovat k výsledkům, které již prošli recenzním řízením v periodících, nicméně si zde dovoluji poznámku. V publikovaných pracích se vyskytuje některé grafy (např. Fig. 6 a 9; příloha 4), které jsou charakterizované na základě lineární regrese. Nicméně se domnívám, a i rozložení experimentálních bodů tomu napovídá, že sigmoidální fit by byl asi vhodnější. Jedná se zejména o grafy závislosti  $\log c$  inhibitoru na funkci aktivity enzymu.

#### Závěr:

Předloženou prací prokázal doktorand schopnost tvůrčí práce v oblasti výzkumu a splňuje tak požadavky kladené na doktorskou disertační práci ve smyslu § 47 zákona č. 111/1998 Sb. o VŠ. K obhajobě práci **doporučuji**.

05.09.2019, Hradec Králové



Ondřej Holas