

POSUDEK ŠKOLITELE STUDENTA K OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE

Student: Mgr. Martina Hrabínová
Školitel: plk. gšt. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.
Školitel-specialista: -
Studijní program: Toxikologie
Forma studia: kombinovaná
Ročník: 4

Název disertační práce: Vývoj metod pro testování látek ovlivňujících CNS

Mgr. Martina Hrabínová vypracovala svou disertační práci na Katedře toxikologie a vojenské farmacie a na Katedře molekulární patologie a biologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany (FVZ UO).

Tématem práce studentky byl vývoj *in vitro* metod pro hodnocení látek ovlivňujících CNS a vývoj expresních systémů pro produkci enzymů, využívaných v rámci tohoto testování. Práce studentky svým obsahem naplňuje schválené téma.

Cílem disertační práce bylo zavedení produkce lidských rekombinantních enzymů betasekretasy (BACE1, EC 3.4.23.46), acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesterasy (BChE, EC 3.1.1.8). Dílčími cíli práce bylo zavedení a validace produkce lidských proteinů BACE1, AChE a BChE ve vhodném expresním systému a optimalizace izolace aktivní lidské rekombinantní BACE1 z buněk. Dále byla dílčím cílem validace purifikace uvedených produkovaných proteinů, jejich charakterizace pomocí určení čistoty, identifikace proteinu protilátkou, stanovení koncentrace, stanovení aktivity, určení kinetických konstant a určení hodnoty IC₅₀ pro selektivní inhibitory jednotlivých proteinů. Úspěšnou produkcí enzymů, vývojem a ověřením uvedených metod a získáním experimentálních dat charakterizujících jednotlivé proteiny studentka splnila vytýčené cíle své disertační práce.

Pro řešení práce byl validován protokol pro kultivaci Expi293F buněk nutných k expresi proteinu. Za účelem přípravy rekombinantních enzymů byly optimalizovány a validovány jednotlivé kroky exprese a purifikace v těchto buňkách. Pro BACE1 bylo nutné vyvinout metodu pro její izolaci z buněk. Byly validovány a optimalizovány metody pro izolaci a purifikaci exprimovaných enzymů a pro každý enzym zaveden specifický purifikační protokol na bázi afinitní chromatografie. Po purifikaci enzymů byla provedena identifikace proteinů s použitím gelové elektroforézy. Identita rekombinantního proteinu byla potvrzena metodou western blot pomocí protilátky. U každého enzymu bylo provedeno hodnocení kinetických vlastností stanovením specifické aktivity, hodnoty K_m a IC₅₀ pro jejich selektivní inhibitor. Zvolené metody korespondovaly s vymezenými cíli práce a v souladu se soudobými literárními prameny. Matematické zpracování naměřených dat bylo provedeno odpovídajícím způsobem a umožnilo získání dat, popisujících biochemické vlastnosti připravených enzymů.

Závěry práce jsou v souladu s provedenými experimenty a získanými daty. Studentce se úspěšně podařilo pomocí vyvinutých metod produkovat rekombinantní lidské enzymy BACE1,

AChE a BChE. Byla ověřena jejich identita a zjištěny základní biochemické parametry. Byla tak potvrzena funkčnost vyvinutých expresních systémů a metod pro hodnocení látek modulujících jejich aktivitu.

Přínosem práce je zavedení produkce rekombinantní lidské BACE1, AChE a BChE a metod pro hodnocení těchto enzymů a jejich inhibitorů na pracovišti Katedry toxikologie a vojenské farmacie FVZ UO. Dostupnost těchto enzymů díky jejich vlastní produkci představuje výraznou finanční úsporu v porovnání s nákupem od komerčních dodavatelů. Produkované enzymy mají zároveň oproti komerčním enzymům od různých dodavatelů relativně uniformní vlastnosti z pohledu aktivity i stability. Dostupnost enzymů na pracovišti usnadňuje posuzování nově vyvíjených potenciálních profylaktických či terapeutických antidot otrav bojovými chemickými látkami pro AČR na pracovišti metodami *in vitro* před jejich hodnocením *in vivo*, čímž dochází k žádoucímu omezení počtu experimentů využívajících laboratorní zvířata. Metody jsou též využitelné při vývoji léčiv neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova choroba.

Studentka v průběhu přípravy své disertační práce prokázala jak schopnost samostatné tvůrčí činnosti, tak i schopnost práce s odbornou literaturou a schopnost publikace získaných výsledků v rámci vědecké komunity. Při vývoji metod a provádění experimentů prokázala zručnost při práci v laboratoři a schopnost samostatného vývoje biochemických metod pro studium vlastností enzymů a jejich inhibitorů a také zpracování a hodnocení získaných dat. V roce 2015 byla hlavní řešitelkou projektu specifického výzkumu na téma „Expres a purifikace lidského rekombinantního proteinu beta-sekretasy (BACE 1) a vývoj kolorimetrické metody pro stanovení její aktivity“, na který navázala v roce 2018 projektem s názvem „Izolace a purifikace beta-sekretasy (BACE 1) z buněčné matrice a vývoj kolorimetrické metody pro stanovení její aktivity“. V průběhu studia byla řešitelkou několika dalších projektů AZV a GA ČR. Své znalosti průběžně zvyšovala účastí na seminářích a kurzech s tematikou své disertační práce. Získané výsledky prezentovala na řadě tuzemských i zahraničních odborných sympozií formou posterů či přednášek. Je hlavní autorkou dvou a spoluautorkou patnácti prací v časopisech s impakt faktorem, na kterých se podílela v průběhu studia. K datu vypracování posudku studentka dosáhla díky dlouholetému zapojení do tvůrčí činnosti katedry vysokého H-indexu 19 s počtem 1018 citací bez autocitací dle Web of Science.

Disertační práce splňuje požadavky na disertační práce stanovené vnitřními předpisy Univerzity obrany, jedná se o dílo původní a naplňuje formální požadavky stanovené Opatřením rektora UO č. 3/2018.

Z výše uvedených důvodů doporučuji disertační práci Mgr. Martiny Hrabínové k obhajobě.

Datum: 18.3.2021

Podpis školitele: