

Posudek oponenta na habilitační práci:

## **Enzymy v cílené modifikaci a diagnostice biologicky aktivních látek**

Autorka: **RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**

Habilitační práce dr. Korecké je zaměřena na její vědecké aktivity v oblasti imobilizovaných enzymů. Jedná se o klasické polymerní i moderní magnetické částice jako nosiče pro systémy štěpící kyselinu hyaluronovou a lakázu. V další fázi pak o elektrochemické imunosenzory, kde enzymy – peroxidáza a alkalická fosfatáza - slouží jako značky pro generování signálu, alternativně jsou využity i kvantové tečky.

Vlastní práce má 70 stran, obsahuje 178 citací, a přiložené publikované práce zahrnují dalších 90 stran, u každé přílohy je vždy jasně uveden podíl a konkrétní příspěvek autorky.

Kapitola 1 podává poněkud učebnicový úvod do enzymologie, následovaný detailnějším pohledem autorky na biokatalytické a značící aplikace vybraných enzymů, se kterými se setkala ve své praxi. Citace pod obrázkem 1 je nesprávná, obrázek je zkopírován z původního zdroje - Koolmanovy učebnice Color Atlas of Biochemistry. Správně je podotknuto, že tento seznam již zastaral - 7. třída translokáz. Str. 8, poslední odstavec, a kde zůstal katal? Tabulka 1, ECLIA, tripropylamin není ani substrát, ani chromogen. Str. 17 prostřední odstavec, dosažení rovnováhy není pro funkci imunosensory (ani ELISA) vyžadováno. Obr. 6, tipnul bych si, že ItalSens není španělská firma. Str. 18, mohla byste dokumentovat své tvrzení „Při použití enzymem značených protilátek dosahuje vyšší citlivosti ALP než HRP“. Str. 19, kvantové tečky nejsou kovové nanokrystaly.

Kapitola 2 se věnuje detailněji imobilizovaným enzymům. Str. 20, můžete ukázat, jak se dá zesíťovat polykaprolakton nebo polyethylenglykol? Obr. 7, mikroskopické obrázky jsou „hezke“, ale bez uvedení měřítka málo přínosné (viz Obr. 10). Obr. 9, co znamenají zkratky PSt- ...atd. ? Str. 27, konec části 2.2, intra nebo intermolekulární provázání?

Kapitola 3 pokračuje v aplikacích imobilizovaných enzymů pro modifikační reakce. Převážně se jedná o hydrolázy – proteinázy. Oproti obecnému přístupu se zde rozebírají vlastní výsledky s imobilizovaným trypsinem (3.1) a papainem – zde je zajímavé využití jeho druhotné glykosidázové aktivity (3.2). Str. 36, v papainu nejsou přítomny hydrazinové skupiny, takže reakcí s aldehydem nemůže vzniknout hydrazon, ale reagují aminoskupiny za vzniku Schiffových bází. Obr. 13 – proč byl při elektroforéze hyaluronátů použit Tris-borát s přídavkem EDTA – jaké to může mít efekty na separaci?

Alternativní štěpení hyaluronátu pomocí lyázy řeší další část (3.3). Obr. 17 resp. tabulka, jak si vysvětlujete téměř stonásobné snížení hodnoty Michaelisovy konstanty?

Dalším příkladem (3.4) je deacylace sfingolipidů a imobilizovaná lakáza (3.5). Na Obr. 23 se hovoří o dekolizaci, přitom se ale objevuje nově absorbance kolem 500 nm, jde tedy pouze o změnu barvy, ne odbarvení?

Kapitola 4 je zaměřena na enzymové značky v elektrochemických imunosenzorech pro alergeny a karcinomové markery. Str. 48 dole, látka stanovovaná imunosenzorem neurčuje typ pracovní elektrody, to ovlivní až detekovaný produkt enzymu zachyceného v rámci imunokomplexu. V části 4.1 bych polemizoval hned s první větou, uvádějící pro

imunosenzory přímou úměrnost mezi spotřebou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a koncentrací analytu (viz i Obr. 25B, kde já nevidím přímku, ale hyperbolu odpovídající saturovatelnému systému). Mimochodem, měřit (Obr. 25) úbytek velké počáteční koncentrace H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je kontraproduktivní; z hlediska citlivosti je rozhodně vhodnější sledovat vznik oxidovaného thioninu z výchozího nulového stavu (redukci na elektrodě). Pokud to správně chápu, tak ovalbumin fungoval jako alergen?

Část 4.2 prezentuje imunosenzor pro HE4 marker s alkalickou fosfatázou jako značkou, dle autorky lepší než peroxidáza. Toto opět nelze brát jako obecný fakt, záleží velmi na dalších okolnostech (DOI: 10.1016/0022-1759(85)90388-6). Kritické porovnání by vyžadovalo pro oba enzymy určit číslo přeměny za daných podmínek.

V kapitole 5 se imunosenzory s peroxidázovou značkou kombinují s nosnou nanočásticí - polyglycidylmethakrylát, což by mělo opět zvýšit odezvy a následně citlivost. Další alternativou je elektrochemický imunosenzor pro HE4 s kvantovou tečkou místo dříve zmíněné alkalické fosfatázy. Vždy mne v těchto souvislostech mrzí, že se nevyzkouší také „normální“ detekce na bázi fluorescence, která je kvantovým tečkám vlastní.

Závěr je prostým souhrnem práce, postrádám nějaké vyzdvižení největších úspěchů či náznak pokračování vědecké práce nebo další směřování oboru studia.

Podstatnou součástí habilitační práce jsou samozřejmě vybrané publikace autorky v celkem 12 přílohách – články v mezinárodních časopisech s impaktním faktorem. Trochu překvapivě je L. Korecká první autorkou pouze jedenkrát u práce z roku 2005, korespondenční autorkou byla sedmkrát. Co se týká aktuálních impaktních faktorů a kvality časopisů: 2x J. Magn. Mater. 2.717 Q2, Macromol. Biosci. 3.416 Q1-2, Carbohydr. Polym. 7.182 Q1, Process Biochem. 2.952 Q2-3, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2.200 Q2-3, Anal. Biochem. 2.877 Q2-3, J. Mater. Chem. 5.968, Electrochem. Commun. 4.333 Q2, Monatshefte für Chemie 1.349 Q3, Talanta 5.339 Q1, Anal. Methods 2.596 Q2. Jde vcelku o dobrý průměr v daném oboru, počet je samozřejmě pro habilitační práci zcela dostačující.

Pohledem do Web of Science lze pro dr. Koreckou nalézt celkem 34 záznamů, poskytujících H-index 10 a 178 citací (bez autocitací), nejvíce dosáhla práce v Macromol. Biosci. 29 citací.

**Závěrem lze konstatovat, že předložená práce splňuje požadavky dané příslušnými předpisy pro habilitační práce a doporučuji ji přijmout jako platný podklad k habilitačnímu řízení dr. Lucie Korecké v oboru Biochemie k udělení vědeckopedagogické hodnosti „docent“.**

V Brně dne 5. 2. 2021

.....  
**Doc. RNDr. Petr Skládal, CSc.**

Ředitel Ústavu biochemie PŘF MU, Brno  
E-mail: skladal@chemi.muni.cz

**M U N I** Masarykova univerzita  
**S C I** Přírodovědecká  
fakulta