

POSUDEK VEDOUCÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Název práce: **Využití indoxylacetátu jako chromogenního a fluorogenního substrátu pro cholinesterázy**

Autor diplomové práce: **Bc. Kateřina Škvorová**

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

Cílem diplomové práce Bc. Kateřiny Škvorové bylo zavést metodu stanovení aktivity a/nebo inhibice cholinesteráz pro destičkový reader Synergy H1M, který umožňuje měření nejenom absorbance v UV/Vis oblasti, ale také měření intenzity fluorescence. Proto byl jako substrát zvolen indoxylacetát, jehož enzymatickou hydrolýzou vznikají produkty, které lze detekovat spektrofotometricky i fluorimetricky. Pro porovnání byla využita klasická Ellmanova metoda.

Úvodní kapitoly teoretické části jsou zaměřeny na strukturu a funkci cholinesteráz. Je popsána také role těchto enzymů v patogenezi neurodegenerativních onemocnění, především Alzheimerovy choroby. V dalších kapitolách je uveden přehled inhibitorů cholinesteráz a možnosti jejich využití. V diplomové práci jsou také zmíněny metody, které je možné využít pro stanovení aktivity a/nebo inhibice cholinesteráz.

Náplní experimentální části bylo stanovení reakčních rychlostí hydrolýz dvou různých substrátů (acetylthiocholinu a indoxylacetátu) katalyzovaných acetylcholinesterázou a butyrylcholinesterázou. Do reakční směsi byly dávkovány různé koncentrace substrátu a enzymu za účelem nalézt vhodnou kombinaci dávající dostatečnou odezvu pro následné testování inhibiční účinnosti vybraných rhodaninových derivátů vůči acetylcholinesteráze. Pro neinhibované reakce byly stanoveny hodnoty kinetických parametrů K_m a V_m . Účinnost testovaných inhibitorů byla vyjádřena hodnotou IC_{50} . Pro porovnání byly jako standardy použity 2 klinicky využívané inhibitory cholinesteráz – rivastigmin a galantamin. Pro všechny studované inhibitory byl z důvodu ověření možnosti jejich přestupu přes hematoencefalickou bariéru určen rozdělovací koeficient a topologická polární povrchová plocha pomocí programu ChemDraw. Získané výsledky byly diskutovány.

Přehled použité literatury svědčí o velmi dobré teoretické přípravě. Autorka pro zpracování diplomové práce využila celkem 91 literárních zdrojů.

Text diplomové práce je srozumitelný, je logicky členěn do jednotlivých kapitol a je doplněn názornými obrázky a grafy. Nicméně autorka se nevyvarovala určitých chyb. V textu

je několik překlepů a gramatických nedostatků. Níže uvádím několik příkladů chybných tvrzení v experimentální a výsledkové části vzniklých spíše nepozorností:

- na str. 48 je chybně uvedený dávkovaný objem enzymu 0,08 ml namísto správného 0,008 ml,
- na str. 66 a 67 je odkazováno na kapitolu 4.1.3, která ale v práci není (správný odkaz je na kapitoly 4.1.2.1 a 4.1.2.2),
- na str. 70 a 71 je v textech odkazujících na grafy 16 a 18 uveden jiný inhibitor, než jaký je potom ve vlastních popiscích těchto grafů.

Při hodnocení vlastní experimentální práce jsem bohužel nucena konstatovat, že studentka byla méně samostatná a pracovala v podstatě pod dohledem školitelky.

Závěrem konstatuji, že diplomová práce splňuje zadání a obsahuje všechny náležitosti. Diplomovou práci **doporučuji** k obhajobě a vzhledem k výše uvedenému hodnotím klasifikačním stupněm „C“.

V Pardubicích 18. 5. 2023

Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.