



OPONENTSKÝ POSUDEK K DISERTAČNÍ PRÁCI

NÁZEV PRÁCE: Vývoj nových insekticidů založených na inhibici cholinesteras

AUTORKA: Mgr. Veronika Hrabcová

Předkládaná disertační práce je zaměřena na studium velmi zajímavé a aktuální problematiky týkající se přípravy a testování nových insekticidů inhibujících hmyzí acetylcholinesterázu, jež by bylo možno využít i v celosvětovém boji s malárií. Tomuto odpovídají i jasně definované cíle disertační práce, jimiž jsou kromě rešeršní činnosti také příprava jak hmyzí wild-type, tak i rekombinantní komáří AChE, které měly být následně využity pro testování široké škály nových AChE inhibitorů. Konečným cílem doktorandky bylo vybrat sloučeniny způsobující nejen nejsilnější inhibici hmyzího enzymu, ale také dostatečnou selektivitu inhibice v porovnání vůči lidské AChE.

Disertační práce je členěna dle klasického formátu, kdy nejprve je zpracována teoretická část, a poté následují části týkající se cílů, použitých metodik, výsledků, diskuze, závěru a příloh. Celá práce je sepsána čtivě, srozumitelně, bez velkého množství překlepů či formálních nedostatků a s dodržением náležitých citačních norem. V teoretické části autorka v souladu s prvním cílem zpracovala na 33 stranách velmi detailní popis týkající se problematiky malárie. V rámci tohoto tématu jsou uvedeny jak parazitologické informace o rodu *Plasmodium*, tak je i následně probrána problematika obsahující aktuální pohled na možnosti vakcinace proti malárii, snahu o regulaci stavu či počtu vektorů malárie v daných oblastech, či přehled dosud poznáných mechanismů rezistence komára rodu *Anopheles*. V tomto kontextu pak autorka vhodně přechází k popisu problematiky aktuálních trendů při hledání nových insekticidů, které se liší dle principu působení. Tato teoretická část je zpracována přehledně, kompletně, s využitím recentních zdrojů. Z určitého pohledu možná nestandardní je rozdělení této Teoretické části do celkem osmi hlavních kapitol, kdy devátou či desátou kapitolou, na stejné úrovni číslování obsahu, jsou již cíle a metodika disertace, a analogicky pak další části DP. Toto je ale jen drobná připomínka týkající se formální stránky DP.



Metodická část předkládané disertační práce je sepsána podrobně, kdy do detailu popisuje většinu experimentálních kroků, které byly postupně prováděny v souladu s cíli DP. Některé metodické postupy jsou popsány méně, či až v následující výsledkové části (např. detekce proteinů v eluovaných frakcích na gelech, resp. popis parametrů elektroforetického dělení – tj. Obr. 34-41). Ostatní části metodiky, a to obzvláště ty zaměřené na použití pokročilých molekulárně-biologických metod, jsou popsány bezezbytku.

Výsledková část se skládá z několika částí, kdy autorka nejprve popisuje výsledky experimentů, jež měly za cíl připravit a purifikovat muší *MdAChE* a rekombinantní komáří *AgAChE1*, stanovit aktivitu purifikovaných enzymů, a nakonec využít daný druh AChE pro stanovení míry inhibice enzymu v přítomnosti syntetizovaných sloučenin, které byly rozděleny do několika skupin dle chemické struktury. Dosažené výsledky jsou následně v samostatné části DP dostatečně diskutovány na 7 stranách a jsou shrnuty v Závěru. V DP je na jejím konci uveden také přehled publikační činnosti autorky, kdy jsou výsledky práce uvedeny ve dvou původních vědeckých pracích uveřejněných v kvalitních renomovaných časopisech s IF, z nichž v jedné je autorka uvedena jako prvoautor, a dále v jednom přehledovém článku publikovaném opět v kvalitním časopisu s vysokým IF.

K práci mám následující dotazy a drobné komentáře:

Dotazy:

1) V teoretické části na str. 20 uvádíte: ... *Za běžných podmínek ionty sodíku aktivují kanál, který se otevře, čímž dojde ke změně náboje (depolarizace) a následnou repolarizaci membrány se kanál znovu uzavře.* ... Můžete, prosím, vysvětlit tuto větu s ohledem na roli Na^+ při otevření Na^+ -kanálů, resp. také při repolarizaci?

2) Při purifikaci enzymu AChE různého původu jste používali afinitní chromatografii. Měřili jste po jímání frakcí také specifickou aktivitu enzymu? Popř. jak byla srovnávána aktivita enzymu mezi jednotlivými purifikacemi v různém čase, a dále, jaký byl typický výtěžek purifikace?

3) Na straně 76 uvádíte, že „...*Rekombinantní protein je však v elúatech v tak malém množství, že po obarvení methylenovou modří není patrný na gelu...*“ Nezkoušeli jste vizualizovat přítomnost proteinů v jednotlivých frakcích pomocí stříbra, nebo Coomassie Blue barvení? S tím i souvisí dotaz, jestli jste výsledky elektroforézy nevyhodnocovali také pomocí denzitometru, což by bylo vhodné např. pro porovnání šířky pruhů proteinů uváděných v textu na str. 78 k Obr. 41.

Připomínky formálního charakteru:

- sloveso ve tvaru „viz“ je obecně psáno bez tečky
- namísto anglického „detoxifikace“ je v českém odborném textu používáno spíše „detoxikace“
- několik tabulek, či popis některých obrázků je rozdělen na dvou po sobě jdoucích stranách (např. legenda Obr. 5, Tab. 26, atd.)
- pojmem „transluminátor“ je pravděpodobně myšlen přístroj „transiluminátor“
- enzymová aktivita by měla být uváděna např. v definovaných jednotkách Units (U/ml; U/mg prot.; U/mg), což by mohlo být využito např. u osy Y grafů 2 a 3 na str. 80 a 81.

Závěrem shrnuji, že Mgr. Veronika Hrabcová během zpracování své disertační práce prokázala schopnost systematické vědecké práce, k čemuž vhodně použila při řešení zadané problematiky celou řadu pokročilých biochemických a bioanalytických metod. Výstupy její DP mohou být využity vzhledem k nálezům silných a specifických inhibitorů hmyzí AChE v praxi, což je zvyšuje kvalitu této DP. Protože všechny kladené cíle práce byly splněny, a to včetně požadované publikační aktivity, **doporučuji předloženou disertační práci k obhajobě.**

V Pardubicích 10.6.2020

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.