

OPONENTSKÝ POSUDEK

disertační práce Mgr. Zuzany Krškové
„Inhibiční aktivita extraktů z *Fontinalis antipyretica* a β -karbolinových alkaloidů na acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu.

Disertační práce byla vypracovaná na Katedře farmakognosie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové pod vedením doc. RNDr. Jaroslava Duška, CSc.

Všeobecný zájem o produkty živé přírody, které se vyznačují zajímavou biologickou aktivitou, a mohly by sloužit jako cenná léčiva, neutuchá. Mezi ně rozhodně patří látky, které inhibují acetylcholinesterasu a butyrylcholinesterasu, tedy enzymy, které hrají důležitou roli při defektech acetylcholinových neurotransmisí související s nedostatkem acetylcholinu v CNS a rovněž porucha glutamátových neurotransmisí. Tyto poruchy se manifestují jako Alzheimerova choroba (AD), která postihuje stále více lidí. Mezi používanými léčivy jsou inhibitory acetylcholinesterázy, které jsou hlavně symptomatické prostředky. Vzhledem k závažnosti AD se výzkum v této oblasti soustředí na přípravu ACHEI jak syntetických, tak na hledání nových molekul s požadovaným účinkem. Do této oblasti lze přiřadit i posuzovanou práci, zaměřenou na aktuální problematiku a zajímavou výběrem experimentálního rostlinného materiálu.

Cílem disertační práce byla analýza obsahových látek ve *Fontinalis antipyretica* se zaměřením na β -karbolinové alkaloidy, čemuž předcházelo určení lokalit s výskytem vodního mechu – prameničky obecné a její sběr. Dalším cílem bylo vypracování HPLC metody, vhodné pro analýsu β -karbolinových alkaloidů. V části zaměřené na biologickou aktivitu bylo cílem stanovit inhibiční aktivitu extraktů z prameničky obecné a vybraných β -karbolinových alkaloidů na ACHE a BUCHE metodou „Fast Blue B salt“ a Ellmanova testu. Dalším cílem, plynoucím z použitých chemikálií bylo zjistit, zda solubilizátor dimethylsulfoxid má vliv na inhibiční aktivitu studovaných β -karbolinových alkaloidů. Tyto cíle autorka experimentální prací dosáhla.

K vyřešení shora uvedených cílů zvolila Mgr. Kršková přístupy, které umožnily získat potřebné údaje se žádoucí spolehlivostí. Z dílčích cílů vyplývá náročnost teoretická i experimentální. Oceňuji použité techniky, které ve spojení s detekčními metodami vedly k řadě poznatků. Získané výsledky mají svou hodnotu a poskytují solidní základ k dalším studiím, zaměřeným na obsahové látky *Fontinalis antipyretica*. Konstatuji proto, že Mgr. Kršková zvolila správné metody a přístupy a prokázala schopnost jejich interpretace.

Mgr. Kršková předkládá práci o celkovém rozsahu 164 stran. Práce má tradiční strukturu, autorka cituje 116 literárních pramenů. Teoretická část (31 stran) má rešeršní charakter a postupně se zaměřuje na botanické aspekty *Fontinalis antipyretica*, obsahové látky a jejich farmakologické vlastnosti. Následují kapitoly o β -karbolinových alkaloidech, jejich výskytu a biologické aktivitě. Pozornost je věnována Alzheimerově nemoci a myasthenia gravis.

Poměrně obsáhlá je část popisující všeobecné znalosti o enzymech. Celou část uzavírá informace o principech hodnocení inhibiční aktivity látek na ACHE a BUCHE.

Teoretická část je zpracována přehledně, čímž autorka dokázala, že se v problematice zorientovala a umí zpracovat literární údaje. Mohla však uplatnit vlastní kritické stanovisko k rozporným údajům v některých citovaných pracích.

Experimentální část přináší, jak je obvyklé, popisy chemikálií, přístrojů, zpracování rostlinného materiálu, použité pracovní postupy a způsob statistického zpracování výsledků. Domnívám se, že obr. č. 7 až 10 měly být zařazeny v kapitole výsledky, protože se týkají HPLC analýzy studovaných alkaloidů a methanolového extraktu *Fontinalis antipyretica*.

Dosažené výsledky jsou dokumentované přemírou tabulek a grafů bez jakýchkoliv komentářů, které by umožnily lepší orientaci. Výsledky rozšiřují a prohlubují stávající znalosti o účincích testovaných β -karbolinových alkaloidů, jednak přinášejí nové poznatky o *Fontinalis antipyretica*. Přítomnost β -karbolinů v pokusném materiálu zůstává podle mého soudu nejasná.

Nepochybuji, že sepsání disertace byla věnována péče, nepokládám ji však za adekvátní významu předložené práce. V práci se vyskytují nepřesnosti (str. 7, 9, 10, 12, 14, 18, 19, 20, 21, 25, 29, 34, 40, 42, 52, 54, 56, 144, 145) a **pravopisné chyby na str. 7, 9, 54, jejichž odstranění u prací, které budou archivovány, pokládám za bezpodmínečné**. Literatura není citována podle doporučených způsobů.

K práci mám následující připomínky a otázky:

str. 10 a následující – chybné označení uhlovodíku s 20 uhlíkovými atomy – správně je eikosan, nikoliv ikosan

str. 10 prosím blíže objasnit využití *Fontinalis antipyretica* jako biomarkeru látek používaných na léčbu bakteriálních infekcí

str. 15 ve vzorcích alkaloidů chybí na atomu dusíku pyrolového kruhu atom vodíku a ve vzorcích harmalinu a harmalolu chybí dvojná vazba (jsou to deriváty dihydro- β -karbolinu)

str. 20 prosím objasnit blíže alkaloidy spektalin a jeho 3-O-acetylderivát

str. 21 uvedený pyrolidinový derivát isoflavonu je rostlinný metabolit?

str. 36 prosím objasnit jednotku katal a vysvětlit údaj, že $1 \text{ kat} = 6\text{E}07 \text{ U}$

str. 43 kdo provedl botanickou identifikaci vodního mechu? Je uložena herbářová položka? Jaké množství *Fontinalis antipyretica* bylo nasbíráno a jaká byla hmotnost po vysušení?

str. 45 proč se připravovaly extrakty methanolem a acetonem? Použil se dříve popsany postup, nebo jde o postup původní?

str. 45 „HPLC metoda ...byla vytvořena na základě experimentů provedených týmem Louise a kol.“ Jaký je Váš přínos k metodě?

str. 50 příprava roztoků podle citovaných prací. Jaká ve skutečnosti koncentrace byla, není uvedeno. Prosím doplnit.

str. 57 prosím vysvětlit způsob stanovení faktoru pro výpočet specifické absorbance. Čím je dán propastný rozdíl mezi faktory pro ACHE a BUCHE?

str. 141 předposlední odstavec značně znejišťuje. Pokud není test s „Fast Blue B Salt“ stoprocentní, čemu lze věřit?

Závěr:

Přiměřená prezentace výsledků formou publikací v odborné literatuře nebo přednáškami, rozhled autorky v problematice, přístup k řešení definovaných cílů s využitím adekvátních metodik, charakterizují Mgr. Zuzanu Krškovou jako kvalitní vědeckou pracovníci. Přestože přítomnost β -karbolinů ve *Fontinalis antipyretica* nebyla jednoznačně prokázána, představuje práce přínos pro vědní disciplínu a zároveň je východiskem pro další experimenty zaměřené na látky interagující s ACHE a BUCHE. I přes výše uvedené poznámky konstatuji, že práce splňuje požadavky kladené na disertační práci. Proto navrhuji po respektování doporučených úprav připustit Mgr. Zuzanu Krškovou k obhajobě a po úspěšné obhajobě disertační práce udělit jí titul Ph.D.

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc.