

AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY
ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE, v.v.i.

Útvar ředitele
Flemingovo nám.2, 166 10 - Praha

Tel.: 220 183 522

E-mail: harmatha@uochb.cas.cz

Fax.: 220 183 582

Prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc
předsedkyně Oborové rady DSP Lékařská chemie a biochemie
Universita Palackého v Olomouci
Lékařská fakulta – Děkanát
Tř. Svobody 8
771 26 Olomouc

Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Jana Heinricha:

**„Studie extraktů plodů *Lonicera caerulea* a *Vaccinium macrocarpon* pro jejich využití
v doplňcích stravy“.**

Fytochemii polyfenolů lze provádět mnoha způsoby. Od klasické izolace a následné identifikace látek běžnými chemickými analýzami, nebo u nových látek pak strukturně analytickými spektroskopickými postupy, až po využití speciálních separačních metod přímo kombinovaných s citlivými hmotnostně spektroskopickými metodami a s využitím dat z předchozích studií, nebo dat nově získaných srovnáváním se známými vhodně zvolenými standardními látkami. Přístup bývá volen vždy podle toho, o jaké informace a požadavky je zájem a jaká je aktuální potřeba pro jejich další využití a hodnocení.

Doktorand pro zadání a potřeby své disertace volil posledně zmíněný přístup, a pak přidal ještě celou sérii dalších navazujících analýz, testů a hodnocení, potřebných pro přípravu podkladů k registraci vybraných látek, nebo jejich rostlinných zdrojů, v doplňcích výživy formou funkčních potravin.

Ve své disertaci se zabývá studiem zdrojů, kterými jsou plody zimolezu modrého (*L. caerulea*) a klikvy velkoplodé (*V. macrocarpon*), jejich extrakty, které byly připravené za laboratorních, ale i průmyslových podmínek, a posléze frakcemi obsahujícími polyfenoly typu fenolových a fenylypropanových kyselin a především těch, obsahujících anthokyaniny. Zabývá se také vývojem a uplatněním kombinace vysokovýkonné chromatografické metody (HPLC) spojené s detekcí a identifikací analytů vhodně uzpůsobenými DAD a ESI-MS detekcemi, především při analýze produktů (většinou již známých fenolických látek) vzniklých v intervenční studii testovaných vzorků.

V úvodní části disertace se věnuje velmi potřebné, protože v různých textech (především marketingového charakteru) nepřesné, až zkomolené nomenklatuře. Věcně i legislativně ji upřesňuje s uvedením příslušných směrnic, někdy i doplňuje vhodnými citacemi, k užítku laické, ba i odborné veřejnosti. Tato část by stála i za separátní publikování pro veřejnost, která stále častěji přichází do styku s takto nepřesnými až zmatečnými reklamními nebo popularizačními informacemi. Popisuje také současný stav trhu s doplňky stravy a jejich legislativu. Přináší i ilustrativní přehled dosavadního hodnocení žádostí o registraci, a jejich schvalování orgány EFSA na základě vyžadovaných zdravotních tvrzení. V této části podává též přehled o zdrojových, jakož i dalších rostlinách, obsahujících využitelné množství stejných, nebo strukturně příbuzných látek. Uvádí i biosyntézu a biogenetické souvislosti fenolů, fenyylpropanoidů a flavonoidů a jim příbuzných anthokyaninů. Vše je pak doplněno o přehled biologických aktivit anthokyaninů a relevantních fenolových kyselin. U vybraných rostlinných druhů jde o užitečný pohled, protože mnohé z nich patří mezi užitkové rostliny, a jejich konzumací lze získávat nebo regulovat příjem a efekt jejich obsahových látek pro zdravotní kondici konzumentů. Výběr druhů pro zde popisované bádání byl kompromisně zvolen tak, aby vyhovoval jak užitečnosti obsahových látek z hlediska nutraceutického účinku, tak i z hlediska jejich vhodnosti pro zkompletování zdravotního tvrzení směřovaného k závěrečnému hodnocení EFSA, a tím i k eventuálnímu praktickému využití.

Analýzy byly zaměřeny nejen na distribuci anthokyaninů ve zkoumaných rostlinách (jakož i relevantních polyfenolů vznikajících v průběhu intervenčních studií), ale i na jejich kvantitu, až do oblasti jejich mezního, minoritního obsahu. Pro analýzu byly plně využity informace i specifické analytické a testovací možnosti, které jsou na obou pracovištích doktoranda již dlouhodobě a úspěšně rozvíjeny, a to nejen pro typ zde analyzovaných látek, ale obecněji. Velká série měření a vhodně zvolený postup, týkající se obou testovaných rostlin, odděleného zpracování laboratorním i průmyslovým způsobem, doplněných pak rozsáhlou intervenční studií, poskytly velký soubor dat, umožňujících celou analýzu posunout až do oblasti úvah o možném komerčním využití.

Práce přináší velké množství výsledků, které doktorand jasně a jednoznačně vyhodnotil, a tímto hodnocením splnil hlavní cíle své práce. K dobru lze přidat i to, že nejen postupy, ale i většina výsledků práce byly již publikovány v několika vědeckých sděleních, a to jak v plném rozsahu v recenzovaných odborných časopisech, tak i v abstraktní formě v konferenčních sbornících. Na těchto publikacích se doktorand spoluautorsky podílel, a také přednesl výsledky své práce na vědeckých setkáních, jak je uvedeno v kapitolách 8 a 9,

týkajících se jeho publikační aktivity. Disertace obsahuje i řadu kvalitních barevných obrázků rostlin, grafu a přehledných tabulek. Chybí však pro chemiky nejvíce ilustrativní, kvalitně znázorněné záznamy HPLC-MS chromatogramů, dokumentujících detekci a identitu zkoumaných látek. Zvolený postup i diskuse jsou dostatečně podloženy studiem literatury zmiňované v odkazech. Literární rešerše k dobře sepsanému úvodu disertace se opírá o neobvykle velký rozsah a pečlivý výběr publikací (až 157 odkazů), a svědčí o dobré přípravě samotného doktoranda i pracovního týmu, ve kterém svoji práci provedl. Tento literární přehled, doplněný ještě dalšími 30 odkazy k diskusi, je dobře vybrán a účelně zpracován, přičemž není jenom podkladem k samotné práci, ale je i kvalifikovaným přehledem pro každého zájemce o danou tematiku.

Disertace je napsána v jazyce českém, v odborně náročném a precizním stylu, přesto však čtivě, a s péčí pro jasné vyjádření všeho důležitého a podstatného. Je i didakticky vhodná pro začátečníky, popularizátory či publicisty zabývající se komercializací v tomto oboru. Zřejmě zde doktorand zužitkoval dovednost získanou spoluautorstvím na šesti publikacích uvedených v příloze disertace, a praxí ve firmě Walmark. Text disertace neobsahuje téměř žádných chyb, jen dva překlepy, asi z nedopatření. Takže z formálního hlediska téměř není co vytknout. Proto zde vybírám jen několik námětů k diskusi. Například:

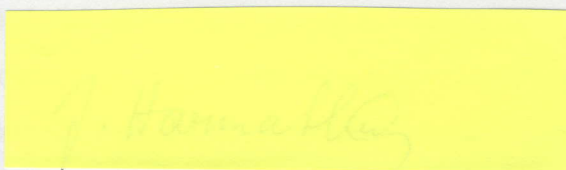
- na str. 12, v 2. řádku, je uveden název pro základní skelet jako 2-fenyl-1,4-benzopyron. Pro flavon by to bylo správně, ovšem pro anthokyanin i obecně pro flavonoid, o kterých se tam mluví, by měl být správně... -benzopyran.
- Na str. 25, v obr. 8 není pro hemiketal vyznačena konfigurace hydroxylu v poloze 2. Proč se to tam obvykle nevyznačuje?
- na str. 56, v tab. 16: je jediný významnější rozdíl mezi L a P extrakty v obsahu kyseliny rozmarýnové. U extraktu P dokonce kyselina rozmarýnová úplně chybí. Proč?
- V odkazech na literaturu (str. 88 - 96) chybí téměř u poloviny odkazů jména spoluautorů, která jsou nahrazena jen dodatkem: et al., což je velmi neobvyklé. Je to formálně pro disertaci přípustné? V některých odkazech dokonce chybí i rok vydání (např. v odkazech 70, 71, 78, 80, 94). U odkazu 79 chybí stránky, a u odkazu 66 chybí vše (ten je zároveň shodný s odkazem 42). Současný čtenář sice v elektronických databásích najde příslušné publikace i podle těchto neúplných dat, ale lze to považovat za profesionální?

Posouzením kvantity a kvality dosažených výsledků a schopnosti jejich interpretace v diskusi s jinými publikovanými informacemi konstatuji, že doktorand zcela prokázal

schopnost a připravenost k samostatné výzkumné činnosti. Spoluautorstvím v dosud publikovaných člancích, a to jak v recenzovaném odborném tisku, tak i na konferencích, prokázal též původnost svých výsledků. Kvalitu práce, kterou svým posudkem zde potvrzují, lze ještě doplnit i o závěr samotného doktoranda uvedený v disertaci, kterým výstižně a stručně dokládá, čím přispěla k poznání v oboru fytochemické analýzy nutraceutik ve funkčních doplncích stravy. Proto tuto disertační práci hodnotím jako vyhovující k dalšímu jednání komise pro obhajoby.

Podle ustanovení *paragrafu 47, odstavce 4, zákona č. 111/1998 S., o vysokých školách* uchazeč prokázal připravenost a schopnost samostatné činnosti v oblasti výzkumu a vývoje, a proto doporučuji přijmout tuto disertační práci k obhajobě, a po úspěšném obhájení i k udělení akademického titulu Ph.D.

V Praze, dne 21. 11. 2011



Ing. Juraj Harmatha, CSc



FARMACEUTICKÁ FAKULTA

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÉ UNIVERZITY BRNO

ÚSTAV PŘÍRODNÍCH LÉČIV

Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc.

54156 2842

E-mail: suchyv@vfu.cz

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Jana Heinricha
„Studie extraktů plodů *Lonicera caerulea* L. a *Vaccinium macrocarpon* AIT, pro jejich
využití v doplňcích stravy“.

V posledních desetiletích nacházejí rostlinné suroviny stále větší uplatnění mezi doplňky stravy (nutraceutiky), které byly vyrobeny za účelem doplnění běžné stravy spotřebitele na úroveň příznivě ovlivňující jeho zdravotní stav. Nejsou tedy určeny k léčbě či prevenci onemocnění. Před uvedením doplňků stravy na trh MZ posuzuje pouze jejich zdravotní nezávadnost, což znamená, že jejich dlouhodobé užívání by nemělo vést k poškození zdraví. Doplňky stravy nemohou dle platné legislativy deklarovat vlastnosti prevence nebo léčby onemocnění nebo na tyto vlastnosti odkazovat. U doplňků stravy není hodnocena jejich účinnost ani biologická dostupnost účinných látek. S ohledem na skutečnost, že řada účinných látek je používána často i v léčivých přípravcích, nelze u některých doplňků stravy jejich účinek vyloučit. K takovým případům patří obsahové látky obou studovaných rostlinných druhů. Pokládám proto předloženou práci za aktuální s možností výstupu do praktického využití výsledků.

Mgr. Jan Heinrich předkládá k získání hodnosti Ph.D. v oboru lékařská chemie a biochemie práci o celkovém rozsahu 96 stran. Práce má tradiční strukturu, autor cituje 187 literárních pramenů. Po Úvodu následuje „Přehled současného stavu problematiky“ (27 stran), má rešeršní charakter a postupně se zaměřuje na problematiku nomenklatury a legislativy v dané oblasti, jsou citovány řády a nařízení EU a porovnány se stavem v USA a v Japonsku, dále popisuje výskyt anthokyaninů v jedlých plodech, včetně jejich biosynthesy. Jsou uvedeny botanické aspekty zimolezu modrého, charakteristika brusinky velkoplodé uvedena není. Následuje přehled biologické aktivity anthokyaninů a fenolových kyselin se zřetelem na protizánětlivou aktivitu. Za přínosnou pokládám část věnovanou farmakokinetice anthokyaninů a fenolových kyselin a jejich možným metabolickým přeměnám. Poslední podkapitola shrnuje dosavadní poznatky o biologické aktivitě obsahových látek zimolezu modrého. Celá tato část je zpracována přehledně a racionálně, čímž disertant dokázal, že se v problematice dobře zorientoval a umí správně, vyváženě a kriticky zpracovat literární údaje.

Cíle disertační práce Mgr. Heinricha lze formálně rozdělit na části, které na sebe logicky navazují a posouvají studium vždy na vyšší úroveň.

- Zhodnocení poznatků z přípravy extraktů studovaných druhů a možnost převedení do průmyslových podmínek.
- Příprava a analýza extraktů a frakcí z plodů zimolezu modrého, u brusinky velkoplodé byl použit standardizovaný extrakt z plodů, dodaný zahraniční firmou.
- Provedení zrychlených a dlouhodobých stabilitních studií tablet s obsahem extraktů studovaných druhů.
- Realizace intervenční studie s plody zimolezu modrého na dobrovolnících a s tím související studie metabolitů v plazmě a v moči.

K vyřešení shora uvedených cílů zvolil autor rozmyšleně na základě literární rešerše a vysoké kvality školícího pracoviště přístupy srovnatelné se současnou úrovní světových pracovišť. To mu umožnilo co nejrychleji a neekonomičtěji dosáhnout jednoznačných výsledků na vysoké vědecké úrovni. Potvrzení dosažených výsledků se opíralo o interpretaci metod, které se navzájem doplňovaly. U některých speciálních metod využil spolupráci

dalších odborníků. Konstatuji proto, že Mgr. Jan Heinrich zvolil správné metody a přístupy a prokázal schopnost jejich správné interpretace. Výsledky jsou uveřejněny v renomovaných odborných časopisech, kde prošly přísným recenzním řízením.

Z významných výsledků uvádím:

- Zjištění vlivu laboratorních a průmyslových podmínek na extrakci obsahových látek z lyofilizovaných plodů zimolezu modrého a porovnání redukční kapacity připravených extraktů
- Stabilitní studie konané s tabletami obsahujícími rozpráškované lyofilizované plody zimolezu modrého vyústí do návrhu pro zvýšení stability tablet.
- Stabilitní studie zaměřené na pevné lékové formy s obsahem extraktů brusinky velkoplodé prokázaly vhodnost komerčního extraktu HiPAC, který je součástí přípravku Urinal Akut.
- Tablety Urinal Akut vykazují během stabilitních studií snižování obsahu všech sledovaných proanthokyanidinů, které jsou účinnými látkami přípravku.
- Při intervenční studii zaměřené na markery oxidačního stresu v krvi a metabolity polyfenolů po konzumaci plodů zimolezu modrého, bylo zjištěno statisticky neprůkazné snížení hladiny produktů pokročilé oxidace proteinů.
- Poznatky a závěry prezentované v předložené práci lze využít při vývoji a výrobě doplňků stravy na bázi plodů zimolezu modrého.

Pečlivá a příkladná formální úprava, konkrétní vymezení cílů a koncisní závěry, to vše přesvědčuje o odborných i praktických kvalitách autora. Dosažené výsledky vztahující se k řešené problematice jsou zveřejněny ve čtyřech publikacích ve vědeckých časopisech (dvakrát je Mgr. Heinrich prvním autorem), dále jsou součástí 5 abstraktů na mezinárodních konferencích.

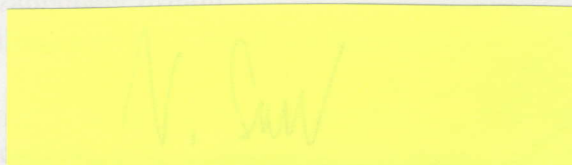
Je patrné, že sepsání disertace byla věnována péče. Z formálního hlediska bych poukázal na jediný překlep (str. 43) a na str. 79 by měly být hodnoty ekvivalentu gallové kyseliny vztaženy na 100 g lyofilizovaných plodů, nikoliv mg. V seznamu použité literatury je několik nedůsledností: neuveden rok vydání časopisu, rozsah stran, jména spoluautorů, strany u monografií.

Pro úplnost mohla být uvedena botanická charakteristika brusinky velkoplodé, i když z ní byl v práci použit jenom extrakt.

Jak lze vysvětlit absenci kyseliny rozmarínové a kyanidin-3-arabinosidu v extraktech připravených průmyslově? (str. 56)

Závěr:

Mgr. Jan Heinrich dokladuje předloženou disertací schopnost samostatné vědecké práce, plánování experimentů, zvládnutí náročných laboratorních metod, jakož i konfrontace vlastních výsledků s literárními údaji. Disertační práce Mgr. Jana Heinricha splňuje všechny podmínky stanovené § 47 VŠ zákona 111/98 Sb., a proto ji doporučuji jako podklad k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby k udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D.



V Brně 19. listopadu 2011.