

Oponentský posudek pro disertační práci

Autor: Mgr. Martina Zatloukalová

Název: Elektrochemická oxidace flavonolignanů a flavonolů a jejich biotransformace *in vitro*

Oponent: Mgr. Martin Bartošík, Ph.D.

Mgr. Zatloukalová se ve své disertační práci zaměřila na studium elektrochemického chování vybraných flavonoidů a flavonolignanů, patřících do skupiny polyfenolů, zejména pak stanovení jejich oxidace, stability, antioxidačních, chelatačních a prooxidačních vlastností, i interakci s DNA nebo membránami erytrocytů. V neposlední řadě zkoumala i toxicitu nových derivátů kvercetinu a taxifolinu na lidských hepatocytech. Práce je dobře a srozumitelně napsána, experimenty byly pečlivě provedeny a vedly k řadě hodnotných výsledků s významem pro daný obor. Autorka během svého studia publikovala úctyhodných 13 prací, přičemž většina z nich se objevila v zahraničních časopisech s IF. Na čtyřech pracích je uvedena jako první autor, dokazující konkrétní přínos předkladatele. Na základě dobře zpracovaných výsledků se dá elektrochemie považovat za velmi slibný a rychlý nástroj pro studium vlastností těchto důležitých látek. Já osobně bych uvítal, kdyby výsledky byly diskutovány hned, anebo alespoň v rámci jedné kapitoly, působilo by to celistvějším dojmem a nebylo by nutné „přeskakovat“ ze strany na stranu. To je spíš otázka vkusu a nevylučuji, že je toto členění standardní.

K předložené práci mám následující komentáře a dotazy:

- Podle obr. 9, který znázorňuje *ex situ* analýzu interakce erytrocytů se silymarinem, se zdá, že pouze komplex je adsorbovaný na elektrodě, a volný silymarin je odstraněn promytím (jeho signál by měl být nízký). Na obr. 32 má však volný silymarin nejvyšší signál (100 %) a při vzniku komplexu se tento signál snižuje. Jak je to správně? Dochází k adsorpci volného silymarinu? Proč byl v předchozích obrázcích použitý sylibin a v tomto případě sylimarin?
- Používala jste elektrodu z pyrolytického grafitu i ze skelného uhlíku. Která, dle Vašich zkušeností, má lepší reprodukovatelnost? Jakým způsobem jste povrchy těchto elektrod regenerovala?
- Na str. 37 píšete, že po přidání EDTA komplex SB/Cu disociuje. V obr. 16B ovšem tento výsledek chybí. Máte ho k dispozici?
- Bylo by jistě zajímavé testovat velikou sadu flavonoidů a flavonolignanů a na základě jejich redoxních potenciálů vybrat vhodné kandidáty pro další studium. Existují práce, které by potvrzovaly korelaci redoxních potenciálů Vámi vybraných flavonolignanů a jejich účinků na lidský organizmus? Anebo se jedná o nové látky, u kterých tyto účinky nejsou známy?
- Na str. 59 tvrdíte, že působením SB/Cu/H₂O₂ může docházet k fragmentaci DNA. Zkoušela jste tuto domněnku ověřit, např. pomocí gelové elektroforézy?

Dle mého názoru předložená práce jednoznačně splňuje požadavky kladené na disertační práce obdobného typu a doporučuji ji k obhajobě.

Brno, 18.3.2015



Mgr. Martin Bartošík, Ph.D.

Oponentský posudek disertační práce

ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE FLAVONOLIGNANŮ A FLAVONOLŮ A JEJICH BIOTRANSFORMACE *IN VITRO*

Mgr. Martina Zatloukalová

Předložená disertační práce sestává z 81 stran textu včetně 5 tabulek, 39 obrázků a 178 odkazů na původní literární zdroje. Struktura práce odpovídá zvyklostem v oboru, je členěna klasicky, přičemž kapitoly Výsledky a Diskuze stojí samostatně. Celkově je napsána na vysoké jazykové úrovni prakticky bez stylistických a formálních nedostatků.

Teoretická část podává na 16 stranách přehled o současném stavu studované problematiky, tedy o rozdělení polyfenolů, jejich fyzikálních a chemických vlastnostech, biosyntéze, biodostupnosti, antioxidační a prooxidační aktivitě a rovněž o experimentálních metodách, využívaných ve výzkumu těchto látek.

Cíle disertační práce jsou formulovány jasně a srozumitelně.

Praktická část práce je zaměřena na několik témat, která na sebe volně navazují. V první části autorka studuje (s využitím široké škály metodik, především pak voltametrických technik) elektrochemické, antioxidační a prooxidační vlastnosti vybraných flavonoidů, druhá část se zabývá studiem interakcí flavonolignanů silymarinového komplexu s membránami erytrocytů a metabolickou studií 3-*O*-galloylquercetinu a 7-*O*-galloyltaxifolinu na lidských hepatocytech.

Oddíl výsledků obsahuje úctyhodný objem experimentálních dat, podpořených množstvím grafického materiálu. Následná diskuze kompaktně shrnuje dosažené výsledky. Interdisciplinární charakter práce a mimořádná informační obsažnost těchto dvou částí klade vyšší nároky na orientaci v textu. V tomto ohledu by dle mého názoru bylo přínosné oddělené kapitoly Výsledky a Diskuze spojit.

Výsledky výzkumu uvedené v disertační práci Mgr. Martiny Zatloukalové vycházejí především z 5 článků, publikovaných v časopisech s vysokými IF, z nichž dvě práce jsou prvoautorské. Je tedy nesporné, že je tím garantována nejen vysoká vědecká úroveň práce, ale také prokázány odborné kvality kandidátky.

Vzhledem ke skutečnosti, že prezentovaná data byla již *de facto* podrobena přísné odborné recenzi, mám k předložené práci pouze několik dotazů, případně námětů k diskuzi:

- Str. 19, kap. 4.1.2 a str. 32, kap. 5.1.1 – „*diastereoizomerů*“
- V teoretické části postrádám bližší charakterizaci a význam studovaných látek. Rovněž u klasifikace polyfenolových látek není zmínka o flavonolignanech, tedy klíčové skupině z hlediska zaměření disertační práce. V tomto smyslu bych uvítal, kdyby autorka rovněž zmínila, proč byly vybrány pro metabolickou studii právě 3-*O*-galloylquercetin a 7-*O*-galloyltaxifolin, jaký je jejich význam a zda mají tyto látky nějakou další souvislost s ostatními analyty, na něž je práce zaměřena.
- V části výsledků a diskuze týkající se metabolické studie na lidských hepatocytech pomocí LC-MS mi chybí stručná diskuze o chování látek v čistém kultivačním mediu bez

přítomnosti buněk. Dle tabulek 4 a 5 se v některých případech výsledky mohou jevit obdobně. Tabulky i ostatní obrázky této kapitoly jsou sice identické s původní publikací, pro účely dizertační práce by možná bylo vhodné naměřená data prezentovat jinou formou, např. grafem, který by názorněji odrážel trendy v úbytcích původních sloučenin. Lze všechny vznikající produkty přisoudit výhradně biotransformačním dějům?

- Byly pro *in vitro* studii metabolismu 3-O-galloylkvercetin a 7-O-galloyltaxifolinu testovány i nižší koncentrace (než zvolených 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), které by věrněji reflektovaly reálné poměry v organismu, kde se fyziologické koncentrační hladiny pohybují o dva i více řádů níže? Pokud nebyly, lze takto získané výsledky analogicky aplikovat i pro řádově nižší koncentrace analytů?
- Většinová část disertační práce je zaměřena na elektrochemické metody jako vhodného nástroje ve výzkumu přírodních polyfenolů, v závěrečné *in vitro* studii je využito identifikačních možností hmotnostní spektrometrie. Mohlo by podle autorky být v tomto ohledu přínosné i přímé (on-line) spojení elektrochemické cely s MS detektorem pro simulaci některých redoxních dějů při studiu biotransformace vybraných látek?

Citovaná literatura v závěru práce je velmi obsáhlá, aktuální a formátově jednotná.

Závěrem konstatuji, že disertační práce Mgr. Martiny Zatloukalové splňuje všechny nároky kladené na tento typ prací. Stanovené cíle byly splněny a dosažené výsledky opublikovány v prestižních periodikách.

Získané poznatky jsou nesporným přínosem v oblasti výzkumu přírodních polyfenolů, mechanismu oxidačních dějů flavonoidů i mechanismu biotransformačních procesů flavonolignanů a flavonolů. Autorka jasně demonstrovala, že je nejen schopna samostatně získávat a interpretovat informace, ale také že ovládla celé spektrum experimentálních a instrumentálních technik, a že je schopna samostatné vědecké práce.

Vzhledem k uvedeným skutečnostem jednoznačně **doporučuji** doktorskou disertační práci Mgr. Martiny Zatloukalové k obhajobě a následně po jejím úspěšném obhájení jako podklad k udělení titulu Ph.D.

V Olomouci, 21. 3. 2015



doc. RNDr. David Jirovský, Ph.D.

Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta
UP v Olomouci