

**Oponentský posudek disertační práce Mgr. Víta Kolečkáře
„Metoda stanovení antioxidačního/antiradikálového působení aplikovatelná ve vyhledávacím
výzkumu přírodních látek“.**

Racionalizace vědecké práce v oblasti přírodních léčiv se v posledních desetiletích promítla do cíleného hledání látek, které se svým účinkem mohou podílet na terapii či prevenci definovaných chorob a jejich příčin. Jsou vyvíjeny skrínigové metody, umožňující z bohaté nabídky rostlinné říše vybrat druhy nebo rody, které obsahují látky s požadovaným účinkem. Následná izolace aktivních substancí je řízena biomonitoringem a po vyřešení struktury lze určit látku zodpovědnou za účinek. Tento postup je umocněn požadavkem „medicíny založené na důkazech“.

Působení volných radikálů kyslíku a dusíku je předmětem intenzivního zájmu badatelů několik posledních desetiletí. Jejich přebytek v živých organismech je dáván do příčinné souvislosti se vznikem celé řady závažných onemocnění a není proto divu, že se výzkum orientuje tímto směrem. Hledají se zdroje známých či nových biologicky aktivních látek, které vykazují antiradikálové působení. Práce vedoucí k pokroku v uvedeném směru je vědecky i společensky aktuální a potřebná. To platí beze zbytku i o posuzované disertační práci, která se v první části zaměřuje na hledání vhodné metody pro stanovení látek s antiradikálovou aktivitou a ve druhé části se zaměřuje na izolaci a identifikaci látek, jejichž zdroj vykazoval ve skrínigu největší aktivitu.

Teoretická část práce svědčí o schopnostech autora zpracovat obsáhlou odbornou literaturu způsobem, který vyústí do srozumitelného přehledu dosud používaných metod pro určení antiradikálové aktivity. Je dán přehled antioxidačních enzymů, nízkomolekulárních endogenních antioxidantů a exogenních přírodních a syntetických antioxidantů. Přehled je vhodně doplněn strukturami popisovaných látek. V další části se Mgr. Kolečkář věnuje vztahům mezi oxidačním stresem a diabetes mellitus typ 2 a aterosklerózou. Popisuje látky ovlivňující trombocytární agregaci. V závěru teoretické části je uveden přehled metod používaných k měření antioxidační aktivity přírodních látek.

Cíle disertační práce jsou přesně definované a logicky na sebe navazují. Za významný považují vývoj DPPH-SIA metody, umožňující stanovení antioxidační aktivity vzorků. Mgr. Kolečkář se zaměřil na rostliny patřící do čeledi Asteraceae. Shromáždil impozantní soubor 87 vzorků, které zpracoval, po extrakci určil metodami DPPH-SIA a FRAP antioxidační aktivitu a vybral pro další experimenty druh *Leuzea carthamoides*, který vykazoval nejvyšší aktivitu. Po extrakci a izolaci získal ze studovaného materiálu 5 čistých látek, které charakterizoval fyzikálně-chemickými metodami, určil jejich strukturu a stanovil jejich antioxidační a antiagregační aktivitu. Na závěr stanovil obsah jednotlivých látek ve zpracované rostlině.

V kapitole Materiál a metody jsou uvedené použité chemikálie a postupy užití při přípravě extraktů a chromatografických nosičů – polyamidu a silikagelu; následuje stručný popis přístrojů a postupů užitých při spektrální analýze. Srozumitelným způsobem jsou popsány použité testy DPPH-SiA a FRAP a test na určení antiagregační aktivity. Konstatují, že Mgr. Kolečkář zvolil k řešení problémů cíleně velmi účinné postupy a metody, které umožnily získat potřebné údaje se žádoucí spolehlivostí. Vysoká metodologická úroveň experimentů je dána jak přístrojovými možnostmi mateřského pracoviště, tak spoluprací se specializovanými pracovišti.

Experimentální část a výsledky jsou spojeny do jedné kapitoly. Tabelárně jsou uvedeny výsledky skrínigu DPPH-SIA testu s příslušným komentářem. Je popsán způsob extrakce listů *Leuzea carthamoides* a jejich další zpracování včetně separace a identifikace obsahových látek. Mgr. Kolečkář ve finální části práce získal z pokusného materiálu 3 flavonoidy (hispidulin LC-1, eriodiktyol LC-2, patuletin LC-3), 3 flavonoidní glykosidy – poprvé popsany patuletin-3'- β -D-xylofuranosid LC-6; 6-hydroxykempferol-7-O-(6''-O-acetyl- β -D-glukopyranosid LC-7) a

eriodiktyol-7- β -D-glukopyranosid LC-8 a dále kyselinu 4-hydroxybenzoovou LC-4 a kyselinu 3,4-dihydroxybenzoovou LC-5. U všech látek byla určena antioxidační a antiagregační aktivita proti standardům kvercetin a troloxu resp. kyselině acetylosalicylové. Výsledky jsou doplněny grafy, tabulkami a histogramy, v případě patuletin-3'- β -D-xylofuranosidu ještě MS fragmentačními spektry při různých ionizačních energiích a ^1H a ^{13}C NMR spektry. Nakonec jsou uvedené výsledky kvantitativní analýzy izolovaných látek v sušině *Leuzea carthamoides*.

Disertační práce má rozsah 102 stran a uvádí 107 literárních pramenů. Pečlivá formální úprava, konkrétní vymezení cílů, jakož i obsáhlá diskuse a koncise závěry, to vše přesvědčuje o odborných i praktických kvalitách autora. Některé pasáže diskuse (kardioprotektivní působení polyfenolů, vliv fenolických látek na vybrané biomarkery) mohly být stejně úspěšně uvedeny v Teoretické části. Závěr shrnuje použité metody a dosažené výsledky.

Cíle disertační práce byly splněny. Dosažené výsledky jsou součástí 7 publikací v zahraničních časopisech s IF, (4x je Mgr. Kolečkář prvním autorem), 2 publikací v českých časopisech a byly prezentovány formou přednášek a posterů na 8 zahraničních a 2 domácích konferencích. Pracovní aktivity pana Kolečkáře dokumentuje ještě dalších 13 publikačních výstupů (z toho 5 publikací s IF), které nesouvisejí s disertací.

Připomínky:

Lingvistický purista by se nesmířil s ignorováním rodu slova „spektrum“ a z toho plynoucí chyby – str. 47, 49, 50 (spektra byly porovnávány), (ale již správně na str. 51, „...spektra se shodovala...“).

Str. 42 – u vyobrazení *Leuzea carthamoides* bylo vhodné uvést měřítko.

Str. 45 – pleonasmus, „frakce byly spojeny dohromady“; jinak snad spojit frakce ani nelze.

Str. 48 – vzorec eriodiktyolu nemá v poloze 7 glukosyl, ale má hydroxyl.

Str. 48 – kolikrát byla opakována preparativní TLC, aby za popsáných kvantitativních poměrů (na desce maximálně 25 mg) se zanalyzovalo 1,37 g odparku?

Str. 60 – prosím objasnit, „nežádoucí pyridiniové vazby v kostní hmotě“

Str. 70 – při údajích o antioxidačních aktivitách se údaj pro BHT jeví jako neobyčejně vysoký při porovnání s α -tokoferolem.

Dvě následující otázky jsou míněné jako úvod do diskuse a vyplývají spíše z mého zájmu o předloženou tematiku.

- str. 47 - vedle hispidulinu se vyskytovala další látka, kterou se nepodařilo získat v čistém stavu. Uvádíte dvě možné příčiny, které se však výrazně liší (rozklad nebo polymerizace). Ke které fabulaci se přikláníte a proč? Jsou takové možnosti popsány u derivátů flavonu?
- V disertační práci by bylo vhodné uvádět sacharid u vzorců glykosidů v příslušné konformaci, aby byla patrné, že jde o β -D-glukopyranosid, resp. β -D-xylofuranosid.

Závěr: Po zhodnocení výsledků uvedených v disertační práci a publikační aktivity konstatuji, že Mgr. Vít Kolečkář prokázal tvůrčí schopnosti a práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v oboru Farmakognosie. Proto doporučuji, aby Mgr. Vítovi Kolečkářovi byl po úspěšné obhajobě udělen podle § 47 VŠ zákona 111/1998 Sb. akademický titul „doktor“ (Ph.D.).

Brno 15.8.2010.

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc.