# Posudek oponenta disertační práce

# „NOVÝ PŘÍSTUP K ELEKTROANALÝZE PRIMÁRNÍCH ŽLUČOVÝCH KYSELIN A PŘÍBUZNÝCH STEROIDŮ“

**Autor: Mgr. Jan Klouda**

Předložená disertační práce je psána v anglickém jazyce na 49 stranách včetně abstraktu a referencí (celkem 78) a její přílohou jsou 3 publikované články autora, v nichž je uveden na 1. místě s vysokým autorským podílem (Bioelectrochemistry, IF 4,722, autorský podíl ~75 %; Electrochemistry Communications, IF 4,33, ~70 %; Critical Reviews in Analytical Chemistry, IF 4,568, ~80 %). Práce obsahuje též seznam výstupů autora – publikace (mj. spoluautor práce v Advanced Materials, IF 27,398), ústní a plakátové prezentace na konferencích a odborných seminářích, a dále přehled absolvovaných zahraničních stáží a grantových projektů, na nichž se podílel jako hlavní řešitel nebo člen řešitelského týmu.

Disertační práce je zaměřena na vývoj nové metody pro stanovení primárních žlučových kyselin – cholové kyseliny (CA) a chenodeoxycholové kyseliny (CDCA). Jejich stanovení je důležité pro diagnostiku a léčbu onemocnění jater a žlučníku. Jako alternativa k dnes nejčastěji používaným, avšak nákladným hmotnostně spektrometrickým metodám kombinovaným s kapalinovou chromatografií a méně spolehlivým enzymatickým metodám byla v předložené práci vyvinuta a optimalizována jednoduchá metoda založená na chemické aktivaci a následné elektrochemické oxidaci těchto žlučových kyselin. Mechanismus aktivační reakce (dehydratace kyselinou) byl navržen na základě výsledků CE-MS analýzy. Optimalizovaný postup zahrnoval dehydratační reakci v 0,1M-$HClO_4$ v acetonitrilu s 0,55% vody a následnou diferenčně pulzní voltametrickou analýzu s pracovní borem dopovanou diamantovou elektrodou. Půvab metody spočívá v možnosti stanovit celkovou koncentraci obou kyselin na základě jejich stejné molární odezvy za optimalizovaných podmínek. Navíc po delší době dehydratace vykazuje CA nový voltametrický signál při nižším potenciálu, což by mohlo umožnit selektivně stanovit CA vedle CDCA. Výsledky stanovení obou žlučových kyselin ve vzorcích umělého a lidského séra vyvinutou metodou se shodovaly s výsledky měření dříve popsanou metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Úspěšně byl testován vyvinutý postup v průtokovém uspořádání s využitím průtokové injekční analýzy s ampérometrickou detekcí. Výsledky shrnuté v disertační práci a ve třech přiložených článcích dokládají, že cíle práce, jasně definované v kapitole 1, byly splněny.

**K práci mám jen několik drobných poznámek, komentářů a otázek:**

- Str. 18: Jakou strukturu má „hyodeoxycholic acid“?
- Str. 19, odst. 3: Větu „Bile acids are essentially aliphatic alcohols, ...“ by bylo vhodnější formulovat např. „Bile acids contain aliphatic alcohol moiety, ...“
- Str. 25, obr. 6: Věta v popisu „Supporting electrolyte in dashed line.“ patrně zůstala omylem z jiného obrázku.
- Str. 28, odst. 2: Autor zde zmiňuje exponenciální nárůst proudového signálu s rostoucí teplotou. V jakém teplotním rozsahu byla aktivace testována a jak případně vypadala proudová závislost pro teploty vyšší než 50 °C?
- Str. 31: Byl experimentálně zjišťován počet elektronů vyměňovaných při elektrochemické oxidaci aktivované CDCA? Jaké metody by bylo možné použít k tomuto účelu?

- Str. 32, obr. 11: Sloučeniny ve schématu jsou číslovány 1, 2, 4 a 5. Proč chybí struktura s označením 3?
- Str. 32: Parametry DPV měření použité pro kvantifikaci žlučových kyselin jsou nestandardní (pulzní amplituda 100 mV a doba pulzu 5 ms). Obvykle se optimální proudové odezvy dosahuje při nižších pulzních amplitudách (do 50 mV) a delší době pulzu. Jaká byla doba registrace proudu při tak krátké době pulzu?
- Str. 33, tab. 2: Co lze zjistit z uvedených hodnot úseku (např. 2,68 ± 2,94)?
- Str. 34, obr. 13 a str. 35, tab. 3: Autor zde uvádí směrodatné odchylky. Jedná se o směrodatné odchylky opakovaného měření téhož vzorku nebo o odchylky z měření opakovaně připravených extraktů?
- Str. 37, tab. 4: Je velmi nepravděpodobné, že jak metoda DPV, tak FIA-AD poskytují kalibrační závislosti se stejnými úseky. Mohl by autor shodu hodnot úseku v tabulkách 2 a 4 komentovat a uvést na pravou míru?

**Otázky k obhajobě:**

- Je známo, že žlučové kyseliny se nacházejí v organismu převážně ve formě konjugátů, zejm. s glycinem a taurinem. Bylo by možné pomocí vyvinuté voltametrické metody stanovit (a případně i vzájemně rozlišit) konjugáty CA a CDCA?
- Mohl by autor nastínit své představy o možnostech zavedení jím vyvinutých metod do klinické praxe a porovnat tyto metody se stávajícími používanými metodami?

Posouzení předkládané práce usnadňuje skutečnost, že obsah popisovaného výzkumu byl již publikován v časopisech s IF, takže každý ze tří článků prošel recenzním řízením a lze tedy očekávat, že většina případných připomínek již byla vyjasněna před jejich publikováním. Téma předkládané práce je vysoce aktuální a důležité pro další vývoj analytických metod. Lze předpokládat, že vyvinuté metody by mohly najít uplatnění v klinické praxi.

Práce je sepsána přehledně, srozumitelně, velmi pěknou angličtinou. Má logickou a dobře promyšlenou strukturu. Shrnuje výsledky velkého množství experimentů a je z ní patrný systematický a kreativní přístup autora k řešení výzkumných problémů. Autor se velmi dobře orientuje jak v problematice analýzy steroidních látek, tak i v oblasti využití elektroanalytických metod a jejich kombinace s metodami separačními. Výše uvedené poznámky a komentáře je možno považovat spíše za formální a mají sloužit autorovi k podpoře jeho dalšího vědeckého bádání.

Mgr. Jan Klouda prokázal, že je schopen samostatné vědecké práce, prokázal své tvůrčí schopnosti v dané oblasti výzkumu a jeho práce splňuje požadavky kladené na disertační práce v daném oboru. Nenalezla jsem žádnou závažnou chybu, která by bránila úspěšnému přijetí této disertační práce a proto ji velmi ráda k obhajobě a dalšímu řízení

***doporučuji.***

V Olomouci, 31. 7. 2020

……

RNDr. Jana Skopalová, Ph.D.
Katedra Analytické chemie, Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Palackého v Olomouci