

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Název rigorózní práce **Porovnání interakce cyanidinu a cyanidin-3-glukosidu s mědí a železem**

Uchazeč **Mgr. Lucie Gavurová**

Oponent **PharmDr. Lucie Smutná, Ph.D.**

Posudek oponenta rigorózní práce

Autorka se ve své práci zabývala interakcí železa a mědi s cyanidin-3-glukosidem a jeho aglykonem, konkrétně studovala redukční potenciál obou polyfenolických látek a jejich schopnosti chelatovat ionty obou zmíněných prvků. Teoretická část práce je rozdělená do několika kapitol popisujících fyziologickou úlohu železa a mědi v organismu, nemocemi v důsledku poruchy jejich metabolismu, působení volných radikálů a popisu anthokyanů z hlediska stability, biologické dostupnosti v organismu a jejich antioxidačního působení. V experimentální části práce je popsán použitý materiál, ale chybí uvedený princip metody, který je však dodatečně vysvětlen v diskusi. Dosažené výsledky jsou dostatečně popsány, nicméně bych preferovala spíše než chaotický dvoustránkový popis všech dosažených výsledků a následné uvedení všech grafů, rozčlenění textu a jeho přiřazení k odpovídajícím grafům. Diskuse velmi dobře hodnotí dosažené výsledky.

Připomínky a dotazy k předkládané rigorózní práci:

1) připomínky k formální a gramatické stránce práce:

- Zejména v abstraktu a teoretické části je patrné nadměrné používání slovesa být.
- V textu práce by bylo lepší uvádět raději než chemickou značku Fe, respektive Cu slovní označení.
- Místo se v práci vyskytují nevhodně zvolená slova, odpovídající spíše populárně naučné literatuře (např. „zneškodnění superoxidového radikálu“ nebo „transferin roznáší železo“).
- V práci je systematicky chybně psáno „viz.“. Nejedná se o zkratku, nýbrž o rozkazovací způsob slovesa vidět.
- Po gramatické stránce – zejména z hlediska psaní čárek – se v práci vyskytuje nadměrné množství chyb (např. podkapitola Hephaestin na str. 14 čítající tři chyby).
- Použití barevného písma není v rigorózní práci standardní ani vhodné, šedá i žlutá barva jsou velmi špatně čitelné. Navíc barevné odstíny použité v práci nejsou konzistentní ani v rámci jedné stránky.
- Ne všechny zkratky v použitých obrázcích jsou vysvětleny, namátkou OAT, CCO.
- V chemických vzorcích je v případě hydrátů solí použita obyčejná tečka místo tzv. „middle dot“.
- Autorka uvádí nejednotně psanou kyselinu bathokuproindisulfonovou (místo s C, jindy s K), rovněž její zkratka je buď BCS nebo BSC.
- Navíc se v práci vyskytuje řada typografických chyb.
- Úprava textu je velmi ledabylá, volba odrážek není v rámci práce konzistentní, v některých odstavcích chybí odsazení prvního řádku. Některé popisky obrázků jsou psány kurzívou, jiné obyčejně.

2) faktické chyby a nevhodné formulace:

- Definice volného radikálu na str. 28 je chybná.
- Chemická rovnice na str. 30 je špatně vyčíslená.

- V názvu podkapitoly „FeSO₄·7H₂O (pentahydrát síranu železnatého)“ je chyba.
- V kapitole přípravy roztoku CuCl je uvedeno, že byl připravený nejprve 0,1 M roztok NaCl a HCl, ale v následující větě je koncentrace NaCl 1 M. Není jasné, zda byla následně navýšena nebo se jedná o chybné uvedení koncentrace. V téže kapitole je také nesprávným způsobem uvedená hustota roztoku „1 l = 1,16 kg“ – v tomto případě by měly být uvedené jednotky hustoty (kg/l).
- V případě obr. 19B, 20B a 23 je na popiscích os uvedeno železo v oxidačním stavu „n⁺“, zřejmě tím bylo míněno Fe³⁺.
- Několik vět v práci je buď dvojsmyslných nebo nedává smysl (např. str. 26 „Důsledkem neschopnosti...“).
- „Absorpce Cu buňkou enterocyty...“ vzhledem k tomu, že enterocyt je buňka, daná formulace postrádá smysl.
- Refluxem mědi je myšlený zřejmě eflux.
- „ATP7A hraje důležitou roli v pohybu Cu napříč mnoha dalšími buněčnými membránami včetně hematoencefalické bariéry a placenty...“. Buněčná membrána ohraničuje buňku a orgány; hematoencefalická bariéra a placenta jsou bariéry.
- Na několika místech v textu je uvedená formulace: „výsledná koncentrace látky byla obvykle 10 mM“. Nejsou upřesněné podmínky, za kterých byla koncentrace odlišná a ani jakých hodnot dosahovala.
- V popisku obr. 16 je uvedeno, že statistická významnost je analogická jako u obr. 11 (Barevné schéma uspořádání roztoků na platě).

3) různé připomínky:

- Úvodní odstavec abstraktu je velmi chaotický, nepřehledný. Autorka přeskakuje od mědi k železu a zpět.
- Obecně v experimentální části postrádám vysvětlení principu použitých metod (ten je však hezky vysvětlen v diskusi na závěr práce) a význam jednotlivých roztoků použitých v experimentu (např. hydroxylamin byl použitý jako redukční činidlo).
- Na str. 11 je uvedená věta: „K redukci Cu²⁺ ze stravy na Cu⁺ dochází působením reduktáz (Steap2, Dcytb), které jsou na apikální straně membrány.“ V případě, že se jedná o lidské reduktázy, měly by být zkratky psány kapitálkami. Membrána je uvedena bez bližší specifikace, o jaký druh buněk se jedná.
- Na str. 37 je za výčtem chemikálií uvedený odstavec popisující složení pufrů, který by bylo vhodnější zařadit spíše mezi přípravu roztoků. Navíc u některých hodnot chybí jednotky a jednotky „mM“ v textu nedávají smysl.
- V kapitole 3.5.4. je uvedeno, že byly použity 4 pufrů o 4 různých pH a testovací roztoky o 4 různých koncentracích. Z textu ani doprovodného obrázku však není zřejmé, zda byly všechny koncentrace testovány při všech hodnotách pH nebo každé koncentraci příslušela 1 hodnota pH.
- Popis přípravy roztoků je nedostatečný, např. na str. 40 není uveden způsob, jakým bylo upravováno pH na požadované hodnoty. V celé práci systematicky chybí uvedení navážek a objemů rozpouštědel nebo alespoň vzorec použitý pro výpočet. V kapitole 3.7.2. chybí dokonce i koncentrace připravovaného roztoku.
- Při popisování provedení chelatačních experimentů (kapitola 3.7.4.) není s výjimkou verze B uvedeno pH použitých roztoků.
- Na str. 46 je popsána příprava roztoku FeCl₃·6 H₂O, jehož výsledná koncentrace je 2,5 –

7,5 mM. To znamená, že byla připravena koncentrační řada nebo každý den experimentu jiná koncentrace? Pokud se jedná o koncentrační řadu, je třeba uvést hodnoty.

- Na obr. 10 a 11 jsou uvedené roztoky testované látky s označením c_1 - c_x . Z uvedeného popisku není jasné, zda byl použitý cyanidin nebo cyanidin-3-glukosid nebo obě látky. Dále chybí údaje o zvolených koncentracích a není mi jasné ani označení c_x .
- Na obr. 12 je v tabulce uvedená formulace „konečný obsah buňky“, kterou bylo zřejmě myšleno obsah jamky. Zvolený způsob zobrazení je spíše zavádějící než názorný, protože evokuje, že v každém řádku plata byl pipetovaný jiný roztok. Totéž nevhodné zobrazení se opakuje i v případě obrázků 13 a 14.
- Kapitola Výsledky je sepsaná velmi nepřehledně, popis veškerých výsledků je uvedený hned na úvod kapitoly, za kterým následuje 10 stránek grafů. V případě porovnávání chelatačních aktivit by bylo vhodné uvést např. do názvu grafu, o jaké pH se jedná. V tomto případě je sice vše popsáno ve vysvětlivkách, ale zvolený koncept není moc přehledný.

4) Otázky:

- Jakými mechanismy je měď vylučována z organismu na molekulární úrovni?
- Na str. 20 uvádíte, že exprese hephaestinu není regulována regulačními proteiny Fe (IRPs). Jakými mechanismy je tedy jeho exprese regulována?
- V kapitole popisující chelataci mědi uvádíte, že zásobní roztok hematoxylinu je použitelný 5 hodin, pracovní roztok hematoxylinu pouze 90 minut. Z jakého důvodu jsou zde odlišnosti mezi stabilitou pracovního a zásobního roztoku? Co znamená omezená použitelnost? Dochází zde k degradaci hematoxylinu? Jaké jsou případně jeho degradační produkty? Za jakých podmínek k degradaci dochází?
- Existuje modelový organismus, na kterém by bylo možné studovat poruchy metabolismu železa a mědi *in vivo*? Pokud ano, byly už v minulosti provedené studie, kde by např. geneticky modifikovaným potkanům byly podávány antokyany nebo jiné přírodní látky za účelem stanovení hladiny mědi/železa v plazmě? Byl srovnávaný způsob podání? Byly pozorovány rozdíly mezi glykosidy a aglykony?

Celkově mám k předkládané rigorózní práci značné množství připomínek, které významně snižují kvalitu práce, ačkoliv po obsahové stránce by se RP dala hodnotit velmi dobře. Přestože se ve většině případů jedná pouze o drobná pochybení, jejich četnost poukazuje na značně nedbalé počínání autorky při zpracovávání textu. Závěrem mohu konstatovat, že rigorózní práce splňuje kritéria pro její doporučení k obhajobě, avšak k případnému udělení titulu "doktor farmacie" požadují odevzdání opravené verze rigorózní práce.

V Hradci Králové, dne 31. 8. 2021

Podpis oponenta rigorózní práce