



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

Posudek oponenta na disertační práci

Mgr. Martin Juhaščík: ŠTÚDIUM KONJUGÁTŮ SFINGOLIPIDŮ S KYSELINOU HYALURÓNOVOU A ICH APLIKÁCIE NA KOŽU.

Oponent: doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Mgr. **Martin Juhaščík** předložil k posouzení svou disertační práci týkající se přípravy a testování vlastností konjugátů sfingolipidů s hyaluronovou kyselinou přes různé linkery.

Práce začíná krátkým úvodem a uvedením cíle práce. V teoretické části student popisuje základní charakteristiky struktury kůže jakožto cílového orgánu připravovaných sloučenin a dále stručně shrnuje strukturní typy a vlastnosti obou komponent cílových konjugátů, tj. ceramidů a kyseliny hyaluronové, včetně základního popisu jejich funkcí. Věnuje se i popsaným chemickým modifikacím kyseliny hyaluronové.

Po teoretickém úvodu a rešerši následuje Experimentální část, popisující použité materiály, využívané metody, postupy provádění jednotlivých reakcí a charakterizace připravených intermediátů i finálních konjugátů. Další podkapitoly Experimentální části uvádějí výsledky studia vlastností připravených konjugátů, fyzikálně chemických vlastností jejich roztoků, resp. jejich dalšího zpracování do technologických forem a charakterizace vlastností těchto produktů z různých hledisek různými metodami (dynamický rozptyl světla, termogravimetrická analýza, stanovení kritické agregační koncentrace, tvorba nanočástic z připravených materiálů, aj.). součástí je i schopnost enkapsulace lipofilní malé molekuly (kurkuminu). Dále poté experimentální část zahrnuje studium potenciálních biologických účinků (protizánětlivé aktivity, ovlivnění bariérové funkce kůže - vliv na transdermální ztrátu vody a ovlivnění transdermální penetrace s modelovou látkou theofylinem).

Další kapitolou práce jsou Výsledky a diskuse. Zde jsou podrobněji diskutována data, získaná experimenty a uvedená v Experimentální části, úspěšnost či komplikace v rámci experimentů a možné potenciální důsledky pro využití připravených konjugátů.

Následuje kapitola Závěr, shrnující provedené práce, úspěchy i neúspěchy a z nich vyplývající možnosti. Práci ukončuje souhrn použité literatury a přílohy jakožto doplňující informace k Experimentální části práce.

Součástí textu je i 43 obrázků (21 v základní části a 22 jako přílohy, jako obrázky jsou označena i reakční schémata a grafy s výsledky) a 7 tabulek (3 v základní části a 4 jako přílohy).

Formální struktura a náležitosti předložené práce jsou vesměs v pořádku.

V práci jsem narazil na několik drobných nepřesností či překlepů např: str. 26 maleínanahydrid; v popisu obr. 19 a 20 je „Odchýlka je vydrená jako SEM...“;

K práci mám následující připomínky a dotazy:

Formální připomínky nebo chyby:

Jako nikoliv zanedbatelnou formální chybu v textu, která se opakuje systematicky v celé práci, bych vytkl způsob zápisu složených jednotek, veličin, molekulové hmotnosti apod., kde vždy



UNIVERZITA KARLOVA Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

chybí oddělovací prvek (lomítko, tečka, nebo alespoň mezera, např. $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ vs. $\text{kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, apod).

Obecně k popisům přípravy intermediátů a konjugátů v Experimentální části: výchozí látka je uváděna v molech, další někdy také, ale většinou jako „ekv.“. Druhý případ není nejvhodnější forma. Lze sice předpokládat, že se myslí molární ekvivalenty k výchozí látce, ale vzhledem k postupům to není vždy úplně jednoznačně zřejmé. Bylo by vhodnější, tak jak je obvyklejší, uvádět všechny komponenty reakce v molárních množstvích, pak je to jednoznačné (ekvivalent si každý spočítá).

Str. 29, 3.9.1, str. 30, 3.9.2: Přesněji by mělo být uvedeno, že pro vysoušení byl použit bezvodý Na_2SO_4 .

Obecně: Pro hmotnostně/objemové vyjádření koncentrace je někde použito označení w/v (např. 3.17), jinde m/v (např. 3.14), mělo by být jednotně.

Str. 46, obr. 11: Ve schématu u vzorce sCer chybí v substituentu R koncové vodíky. V vzorci HA-sCer v N-acetylglukosaminu je nekorektně napojená volná sekundární alkoholická skupina.

Popis obrázku 15 je na jiné straně než samotný obrázek, bylo by vhodnější, kdyby byly na stejné straně i za cenu poloviny prázdné stránky.

Dotazy:

Str. 20, 2.3.1., druhý odstavec: Můžete blíže vysvětlit, jak by HA mohla být využita pro cílenou protinádorovou terapii? Často se uvádí, že vysoké hladiny HA různými mechanismy spíše podporují rozvoj nádorů. Máte-li na mysli analogii antibody-drug konjugátů, existují nějaké studie v této oblasti?

Str. 29, 3.8.: IPA v pětinásobku vůči čemu byl použit pro vysrážení produktu?

Str. 41, postup 4.1.1.1: Zkoušel jste hledat důvod, proč silnější báze snižuje podíl amidace a zvyšuje podíl esterifikace v reakci? Dalo by se to očekávat spíše opačně, pro konjugace v biologických molekulách formou amidace se obvykle používá/vyžaduje prostředí o pH 8,5 i vyšší. Nepomohlo by ještě výraznější snížení teploty reakce?

Str. 42, postup 4.1.1.2, dole: Z čeho jste usoudil, že vyšší acidita karboxylu maleinátového linkeru snížila jeho reaktivitu? Nejde spíše o menší flexibilitu linkeru, resp. sterické důvody, vyplývající z *cis*- uspořádání linkeru?

Str. 44-46, 4.1.2.2 a obr. 11: Ve schématu je u finálního produktu znázorněna kromě esterifikace HA molekulou sCer také benzoylace. Tento proces, resp. produkt není diskutován. Pozorovali jste benzoylaci, resp. je benzoylovaný produkt stabilní? Pokud vzniká, jak benzoyl skupiny mohou ovlivnit vlastnosti produktu, není to nežádoucí jev? Kdyby byla esterifikace provedena jinou metodou, bez možnosti benzoylace, vznikl by pravděpodobně produkt s jinými vlastnostmi?

Str.51, 4.1.5: V rámci diskuse je uvedeno, že v experimentech s HA-sCer dochází po 48 a 72 h od aplikace k nárůstu viability buněk. To dle grafu na obr. 13 platí pro koncentrace HA-sCer obou molekulových hmotností 10, 100 a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, nikoliv pro 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kde je viabilita stejná jako u kontroly. Je možné to nějak vysvětlit?



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

Celkově práce zahrnuje syntézy a charakterizace několika nových modifikovaných molekul ceramidů a kyseliny hyaluronové a prezentuje významné množství experimentální práce zkoumající vlastnosti připravených látek. Přes výše uvedené připomínky je práce nesporně významným přínosem pro výzkum v dané oblasti.

Závěr:

Předložený text svým obsahem a rozsahem splňuje kritéria pro práce tohoto charakteru dle § 47, odst. 4, zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, doporučuji ji k dalšímu řízení a v případě úspěšného průběhu obhajoby doporučuji, aby Mgr. Martinu Juhaščíkovi byl udělen titul Ph.D.

V Hradci Králové, 16.4.2024

Doc. PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.
Katedra farmaceutické chemie a
farmaceutické analýzy
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova
Akademika Heyrovského 1203
500 03 Hradec Králové