

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Studijní program: Bioanalytická LDZ

**Posudek oponenta diplomové práce**

Rok obhajoby: 2024

Autor/ka práce: **Bc. Anežka Pokorná**  
Vedoucí práce: doc. PharmDr. Mgr. Martin Krátký, Ph.D.  
Konzultant/ka: Mgr. Enikő Šikorová  
Oponent/ka: doc. PharmDr. Jan Zitko, Ph.D.  
Název práce: **Příprava a studium potenciálních antimikrobních sloučenin**  
Rozsah práce: 67 stran, 10 obrázků, 6 tabulek, 44 citací

**Hodnocení práce:**

- |  |             |
|--|-------------|
| a) Odborná úroveň a zpracování teoretické části:               | velmi dobrá |
| b) Náročnost použitých metod:                                  | výborná     |
| c) Zpracování metodické části (přehlednost, srozumitelnost):   | velmi dobré |
| d) Kvalita získaných experimentálních dat:                     | výborná     |
| e) Zpracování výsledků (přehlednost, srozumitelnost):          | výborné     |
| f) Hodnocení výsledků včetně statistické analýzy:              | velmi dobré |
| g) Myšlenková úroveň a rozsah diskuse výsledků:                | velmi dobrá |
| h) Srozumitelnost, výstižnost a adekvátnost závěrů:            | výborná     |
| i) Splnění cílů práce:   | výborné     |
| j) Množství a aktuálnost literárních odkazů:                   | velmi dobré |
| k) Jazyková úroveň (stylistická a gramatická úroveň):          | výborná     |
| l) Formální úroveň práce (členění textu, grafické zpracování): | výborná     |

Doporučuji diplomovou práci k uznání jako práci rigorózní

**Případné poznámky k hodnocení:**

Práce se zabývá syntézou a biologickým hodnocením potenciálních antimikrobních sloučenin, konkrétně se jedná o iminy či amidy odvozené od 4-amino-1-benzylpiperidinu. Členění práce je obvyklé. V úvodní části se autorka věnuje formálnímu dělení antibakteriálních sloučenin (kde nerozlišuje pojmy antibiotikum vs. antibakteriální chemoterapeutikum) z mikrobiologického a klinického hlediska a z hlediska mechanismu účinku (cca 5 stran). Dále je popisován jev antimikrobní rezistence, její význam, způsob šíření a klinické vyšetřování citlivosti patogenů (8 stran). Tím teoretický úvod končí. Citelně mi zde chybí farmaceuticko-chemická rešerše, která by lépe objasnila design zamýšlených struktur (k tomu otázky 1 a 2 níže). Vzhledem k provedeným biologickým testům také v úvodu mohla být alespoň stručně zmíněna Alzheimerova nemoc a pro forma vysvětleno, proč jsou inhibitory AChE potenciální léčiva tohoto onemocnění.

Celkem bylo připraveno a testováno 15 finálních sloučenin. Syntéza byla jedнокroková a jednalo se buď o kondenzaci aldehydu s aminem za vzniku Schiffovy báze, či (ve dvou případech) přípravu amidů pomocí EDC/HOBt couplingu. Připravené sloučeniny byly spolupracujícími pracovníci testovány na in vitro antimykobakteriální a antibakteriální aktivitu

a na inhibici AChE/BuChE. Chemické i biologické výsledky jsou diskutovány. Z jazykového hlediska je práce na vysoké úrovni a obsahuje jen malé množství překlepů a chyb.

Kontrola podobnosti práce v systému Turnitin indikuje kumulativní shodu ve výši 33 % s nevyšší shodou k jednotlivému dokumentu 3%. Systém Theses indikuje kumulativní shodu ve výši 26 %. Zdrojem shod jsou nejčastější diplomové práce ze stejného pracoviště a na podobná témata (např. DP Jana Sýkorová, 2022). Shodné části jsou buď ojedinělá ustálená slovní spojení, nebo se nachází v části popisu přístrojového vybavení či ustálených metodik biologického hodnocení, které diplomantka sama ani neprováděla). Shody v těchto částech jsou pochopitelné a akceptovatelné, i když na str. 28 v části 4.1 Obecné postupy jsou převzaty celé odstavce a osobně bych zde o přiznání zdroje formou citace minimálně uvažoval. Po podrobném prostudování protokolů o kontrole podobnosti hodnotím práci jako originální.

Dotazy a připomínky:

Poznámky:

- Na str. 29 dole uvádíte, že čistota sloučenin byla posuzována mimo jiné na základě teplot tání. Jak lze od teploty tání odvozovat informaci o čistotě a jak se to slučuje s faktem, že ve vaší práci reportuje teplotu tání nikoliv jako rozmezí, ale jako jedinou hodnotu?
- Chybějící detaily ke stanovení AChE/BuChE inhibiční aktivity. Není uvedeno, o jaké proteiny se jedná (i když z kontextu je patrné, že lidské), chybí informace o statistice – počet replikátů, zda byla nějaká preinkubace, způsob proložení křivky závislosti inhibice na koncentraci. Je sice řešeno odkazem na publikovanou práci, kde je metodika popsána, ale tyto základní informace bych uvítal i přímo v práci.

Drobné a typografické (není třeba reagovat):

- - str. 29 nahoře - věta „principy číslování připravených sloučenin jsou uvedeny na obrázku“ je uvedena duplicitně. Výraz „číslování sloučenin“ bych navíc chápal ve smyslu názvoslovného číslování, tj. přidělení lokantů. Vhodnější výraz ve vaší větě by byl např. „označování vodíkových atomů/protonů pro účely popisu NMR spekter.“
- Seznam zkratk PBS - phosphate buffered saline. Má tento výraz nějaký český ekvivalent? V textu je již český výraz uveden správně.
- Názvy a popisy tabulek je v odborné literatuře obvyklé uvádět nad tabulkou, nikoliv pod tabulkou (na rozdíl od obrázků a schémat).

Otázky:

1. DESIGN - Jakým způsobem byly voleny substituenty na (hetero)aromátu, tj. v původně aldehydické, resp. kyselinové části? V práci uvádíte, že to bylo na základě přechozích publikací. Můžete během prezentace ukázat nějaké konkrétní příklady sloučenin, ze kterých design vycházel? Je známo, jakou specifickou roli konkrétní substituenty mají pro mechanismus účinku, fyzikálně-chemické vlastnosti, či farmakokinetické vlastnosti včetně případné toxicity? Aromaticky vázaný jod či nitroskupina (nitrované pětičlenné heterocykly) jsou často zdrojem toxicity. Komentujte.
2. DESIGN – Proč byl jako základ zamýšlených struktur zvolen benzylpiperidinový fragment? V části 3. Cíl práce uvádíte, že to je fragment, který byl účinný u sloučenin s anticholierázovou aktivitou. Opět, můžete v rámci obhajoby ukázat konkrétní předlohy struktury? Má benzylpiperidinový fragment opodstatnění i pro antimikrobní aktivitu?
3. K obecným reakčním schématům – příprava iminů je kondenzační reakce, doplňte odstupující molekulu. Během prezentace zvažte doplnění mechanismu EDC/HOBt couplingu.

4. V obecných postupech zpracování vašich reakcí často zaměňujete pojmy precipitát a krystal. Např. na str. 30. „látko byla KRYSTALIZOVÁNA při teplotě -20 st. Celsia“, získaný PRECIPITÁT byl promyt hexanem a KRYSTALY byly vysušeny. Jak byste popsala definiční rozdíl mezi precipitátem a krystaly? Jaká pevná forma tedy převažovala u vašich finálních produktů?

5. U sloučenin, které při vymrazení z MeOH reakční směsi nevypadly, tj. například u látky AP 3, uvádíte jako způsob zpracování reakce odpaření rozpouštědel, převedení malým množstvím ethyl-acetátu do vialky a opětovné odpaření. V takovém případě zde ale ovšem chybí čistící krok, kterým u ostatních vypadnuvších produktů byla krystalizace. Pokud se příslušný salicylaldehyd používal v nadbytku 1,1 molárního ekvivalentu, znamená to, že nutně ve vaší finální směsi je musel nějaký aldehyd zbyť. Nebo předpokládáte, že byl odstraněn pomocí destilace? Jaká je jeho teplota varu? Problém s olejovitými produkty s v práci vyskytuje opakovaně. Neuvažovali jste v případě olejovitých produktů o zařazení nějaké čistící operace? Jaký by mohl být způsob čištění těchto produktů?

6. Při TLC analýze reakční směsi jste používala mobilní směs toluen - ethylacetát 4:1 a typické retenční faktory se produktů se pohybovaly od 0,1 do 0,2, což je poměrně nízko. Bylo za těchto podmínek možné dobře odlišit skvrny produktů a výchozích látek? Jak vypadalo typické TLC? Neuvažovala jste o použití polárnější mobilní směsi, aby byly skvrny lépe rozlišeny?

7. Všechny vaše finální produkty typu iminů uvádíte v E-konfiguraci na dvojně vazbě. Z čeho tuto konfiguraci odvozujete? Jaké znáte metody pro určení 3D struktury / konfigurace malých molekul?

**hodnocení, práce je: výborná**

**k obhajobě: doporučuji**

V Hradci Králové

3. června 2024

podpis oponenta/ky