Oponentský posudok

na doktorskú dizertačnú prácu Mgr. Lukáša Opálku

Syntéza lidských ω-O-acylceramidů a hodnocení jejich vlivu na bariérové vlastnosti kožních lipidových membrán

Predložená dizertačná práca je zameraná na problematiku štúdia *stratum corneum* ľudskej kože prostredníctvom modelových lipidových membrán. Tak ako je to v prípade zdravého organizmu, vhodnosť modelov je posudzovaná z hľadiska transverzálnej a laterálnej štruktúry, zatiaľ čo ich funkčnosť je hodnotená prostredníctvom priepustnosti malých molekúl a vody. Diskusia zasadzuje dané charakteristiky do kontextu (pato)fyziologických princípov homeostázy kože, ktoré podčiarkujú opodstatnenosť a dôležitosť práce pre modernú biomedicínu a farmakológiu. Najdôležitejším výsledkom dizertačnej práce je určite vypracovanie kompletného chemického postupu prípravy komponentov funkčného modelu, ktoré v mnohých prípadoch nie sú komerčne dostupné. Aj z iných oblastí vedy a výskumu sú známe príklady, keď sa komerčná dostupnosť premietla do geometrického nárastu experimentálnych výsledkov; za všetky príklady spomeniem vplyv komerčnej výroby silikónových podložiek na experimenty neutrónového rozptylu a difrakcie.

Práca je napísaná kultivovaným spôsobom a má dobrú úroveň. Úvod je venovaný opisu najdôležitejších vlastností a funkcií kože v organizme. Je prehľadný a veľmi poučný aj pre nováčikov v odbore. Samozrejme, na celú problematiku sa pozerá hlavne z pohľadu chemického, keďže práca je súčasťou širších projektov riešených v kolektíve doc. Vávrovej na Katedre anorganickej a organickej chémie. Okrem širšieho autorlistu na publikáciách v žurnáloch, v tlači, alebo ešte vo fáze recenzií je priame zainteresovanie celého kolektívu vidieť aj z množstva práce, ktorá je v dizertácií prezentovaná. Takáto kolaborácia je bezo sporu nesmierne dôležitá skúsenosť pre autora ako samostatného vedca, ktorý v dnešnom výskume ale musí byť schopný širšej spolupráce. Napriek tomu, rád by som vyzval autora na konkrétnejšiu identifikáciu vlastného vkladu v experimentoch, ich návrhoch a vyhodnocovaniach výsledkov prezentovaných v dizertácii.

Jadro dizertačnej práce tvorí časť „Výsledky“, ktorá je priamou odpoveďou na stanovenie cieľov v úvode práce. Autor nepochybne splnil cieľ *de novo* syntézy acylceramidov. Táto podtrieda ceramidov s ultradlhými reťazcami sa dostatočne odlišuje od ostatných ceramidov a jej biosyntéza v organizme pozostáva z niekoľkokrokového procesu. V príprave kompletnej laboratórnej syntézy sa osobitosť tejto skupiny vyznačuje nízkou rozpustnosťou a reaktivitou, ktoré spôsobujú nízky výťažok v prípade ak je priebeh syntézy vôbec popísaný. Práca na návrhu a optimalizácii takéhoto procesu je preto obzvlášť hodná uznania a sama o sebe predstavuje materiál vhodný pre dizertačnú prácu. Jednotlivé kroky chemickej syntézy sú patrične dokladované rovnicami a výsledné produkty overené rôznymi analytickými metódami. Aj keď tieto metódy netvoria cieľovú časť práce a ich vysvetľovanie by nebolo na mieste, stručné konštatovanie zmyslu použitia danej metódy a prípadné referencie na literatúru by boli vhodným doplnením vedeckej stránky práce.

Jednou z metód použitých na charakterizáciu štruktúry pripravených modelov je prášková difrakcia RTG žiarenia, vďaka priamočiaremu poskytovaniu informácii o usporiadanosti a periodicite lamelárnych štruktúr. Merania obvykle prebiehajú

skenovaním priestoru uhlov vzorky a detektora, pričom špeciálnym módom (tzv. symetrický sken) je možné vybrať len komponentu rozptylového vektora pozdĺž normály lamiel. Transverzálna periodicita a štruktúra sa potom určuje z grafov podobných tým na Obr. 27 a 30 s x-ovou osou v jednotkách uhla detektora (2Theta), alebo v univerzálnych jednotkách vektora rozptylu Q ($Q=4\pi \sin\theta/\lambda$, kde uhol rozptylu je 2θ) ako je s malým preklepom zadefinované v kapitole „Experimentální část“. Na tento preklep upozorňujem autora zámerne, nakoľko sa v rovnakej obdobe vyskytuje aj v príspevkoch v Prílohe 1 a 4. V prílohe 4 sú navyše neštandardne použité hneď dva parametre reciprokého priestoru, *Q* a *s*, ktoré však vo Fig. 1 nespĺňajú vzájomný vzťah $Q=2\pi s$ (napr., difrakčný rád 14 je zobrazený v $Q\sim8.3$ nm^{-1}, ktorému by malo zodpovedať $s\sim1.3$ nm^{-1}, zatiaľ čo vloženie v obrázku ukazuje hodnotu takmer 12 nm^{-1} – zaujimavé je, že v danom prípade by 2Theta uhol zodpovedal hodnote $\sim11.7^{o}$, no tento parameter na druhej strane nie je lineárne závislý od difrakčného rádu). Súdiac podľa súvislostí ostatných výsledkov sa však táto chyba javí len formálnou.

Kľúčovými sa ukázali difrakčné experimenty najmä pri odhaľovaní a rozlišovaní krátkej a dlhej lamelárnej fázy. Okrem pozície peakov bola analyzovaná aj ich šírka. Difrakčná teória vysvetľuje niekoľkými vplyvmi prečo sa experimentálne meraný tvar odlišuje od ideálnych delta funkcií k funkciám, ktoré sa vo všeobecnosti ukázali byť kombináciou Gaussiánu a Lorentziánu. V princípe ich možno rozdeliť na dve skupiny podľa toho či sú zviazané s 1) inštrumentom alebo 2) vzorkou. Prvá kategória ovplyvňuje takmer výlučne tvar všetkých peakov rovnako, zatiaľ čo druhá kategória obsahuje aj vplyvy, ktoré sú funkciou rádu difrakčného peaku, alebo jeho pozície. Jedným z najvýznamnejších vplyvov z druhej kategórie je „vlnenie“ lamiel. Nárast pomeru šírky vyššieho rádu k nižšiemu (napr., $\Delta s2/\Delta s1$ používané v dizertačnej práci – na strane 55 je zrejme mylne uvedený pomer $\Delta s1/\Delta s2$) potom charakterizuje stupeň fluktuácií lamiel od ich perfektného usporiadania. Je nutné si uvedomiť limitovanú presnosť takéhoto prístupu, ktorá je výsledkom štatistických chýb a použitím zjednodušeného tvaru reprezentácie peakov (napr., jednoduchý Gaussián, alebo Lorentzián). Výsledky pomerov nižšie ako 1 sú práve takýmto výsledkom a neprináleží im štatistická signifikantnosť.

V časti „Diskusia“ sa autor vracia k najdôležitejším výsledkom, pričom z nich konštruuje dostatočne ucelený obraz študovaného zadania. Dielčie ciele dané do vzájomného súvisu a kontextu štúdie sa tak stávajú časťou systematického výskumu. Pozitívny dojem práce na koniec uzatvára časť „Záver“, v ktorej je pravdivo konštatované naplnenie stanovených cieľov dizertácie.

Moje záverečné hodnotenie je nasledovné. Téma dizertačnej práce je veľmi aktuálna a príťažlivá. Dizertačná práca nepochybne splnila stanovené ciele. Téma bola spracovaná veľmi precízne s použitím moderných metód. Vďaka novo navrhnutému postupu chemickej syntézy môže slúžiť bázou pre rad ďalších výskumov fyziky, chémie a biológie *stratum corneum*. Doktorská dizertačná práca Mgr. Opálku spĺňa i napriek vyššie uvedeným nedostatkom po formálnej a vecnej stránke požiadavky na takúto prácu a jednoznačne navrhujem jej prijatie k obhajobe.

Mgr. Norbert Kučerka, PhD.

Katedra fyzikálnej chémie liečiv

Farmaceutická fakulta UK v Bratislave