

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI
KRÁLOVÉ**

Téma disertační práce	Design of new antibacterial active molecules
Jméno studenta, studentky	Mgr. Eva Vavříková
Jméno oponenta	doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

II. Posudek oponenta

Mgr. Eva Vavříková předložila k obhajobě disertační práci, která není ani obvyklým disertačním spisem, ani souborem publikovaných prací s komentářem. Práce č. II je pouhým překladem práce č. I a práce č. III a IV nebyly dosud publikovány a ani nejsou doloženy potvrzením o přijetí k tisku. V komentáři jsou zbytečně uváděny i údaje obsažené v příložených publikacích, produkty pak mají jiná čísla v komentáři a jiná v publikacích, což činí práci nepřehlednou.

K předložené práci mám několik dalších připomínek a dotazů:

- Slovo *active* v názvu práce mi připadá zbytečné; slovní spojení *antibacterial compounds* samo o sobě vyjadřuje, že se jedná o sloučeniny s antibakteriálním účinkem
- Název kapitoly 3, *Chitosan as a prodrug*, je nesprávný a svědčí o tom, že autorka správně nepochopila, co je a co není profarmakum. Chitosan, případně ireversibilně modifikovaný chitosan, je buď léčivo (pokud se terapeuticky využívá jeho vlastních biologických účinků) nebo polymerní nosič pro nízkomolekulární léčivo, které je na něj vázáno snadno štěpitelnou vazbou a *in vivo* se z něj uvolňuje. Pokud se na konečném účinku podílí jak uvolněné nízkomolekulární léčivo, tak chitosan (případně jeho analog) jedná se o tzv. *mutual prodrug*. Transportní systémy, např. nanomicely, nanočástice, liposomy apod. se za profarmaka nepovažují.
- Str. 9, 3.3.1 místo *Mechanism of activity* by bylo vhodnější použít běžnější termín *Mechanism of action*.
- Str. 9 – v prostředním odstavci se píše, že účinky chitosanu s různou MW byly studovány na *S. aureus* a *E. coli*, pak se píše o mykobakteriální stěně a pak opět o dvou kmenech. V textu má pravděpodobně být bakteriální stěna.
- Str. 10 – co se myslí výrazem *O-specific oligosaccharide units of lipoproteins*?
- Str. 13 – v textu má být *N,N*-dimethylaminophenyl místo *N,N*-dimethyl-1-aminotolyl a vhodnější název pro první ze substituentů R v Fig. 4 je *N,N,N*-trimethylanilinium, nikoliv *N,N,N*-trimethylbenzenaminium.
- Str. 18 – Halst je příjmení (zkratka příjmení) jednoho z vědců, kteří *Colletotrichum lagenarium* klasifikovali (Ellis & Halst.) a musí tedy být psáno s velkým začátečním písmenem; podobně Pers. u *Botrytis cinerea*.
- Str. 25 – destrukce membrány je důsledkem lipidové peroxidace, nikoliv obráceně.
- Str. 30 – jaké rozmezí MIC se považuje *very good antimycobacterial activity* v daném biologickém testu?
- Str. 33 – Fe^{2+} a Fe^{3+} jsou důležité pro mykobakterie, ale pro transport do mykobakterií jsou důležité ještě *siderofory* produkované mykobakteriemi. Můžete pojem *siderofor* vysvětlit?
- Na str. 49 a 53 by množství reagentů mělo být uvedeno nejen v mg, ale také v molech. Kromě toho není zcela jasné, zda byly reakční směsi přes noc uchovávány v chladničce nebo mrazničce. Vzhledem k tomu, že reakčním prostředím byla voda, musela by směs přes noc zmrznout.
- Práce I a II již prošly recenzním řízením v časopisech a proto jsem se jejich kvalitou blíže nezabývala. Práce III vychází z předpokladu, že *Chitosan conjugates with antituberculous drugs could be potentially effective in the non-toxic chemotherapy of tuberculosis*. I přes velké množství experimentální práce není tento předpoklad v závěru práce ani potvrzen, ani vyvrácen, protože biologické výsledky jsou v předložené podobě neinterpretovatelné. Zásadním nedostatkem je, že

účinnost a toxicita nejsou porovnány s účinností a toxicitou volných, na chitosan nenavázaných antituberkulotik. Dále není jasné, co vlastně v biologickém testu působí (celý komplex, uvolněné antituberkulotikum, fosforylovaná forma nebo derivát s volnou hydroxylovou skupinou, případně všechno dohromady). V případě derivátů *O*-karboxymethylchitosanu se zdá, že navázané antituberkulotikum nemá na konečný biologický účinek žádný vliv a nositelem antimykobakteriálního účinku je samotný *O*-karboxymethylchitosan, jehož účinek je závislý především na počtu volných aminoskupin (stupni deacetylace). Nízká antimykobakteriální aktivita *N*-sukcinylochitosanu není překvapující, protože většina jeho aminoskupin je buď acetylována, nebo sukcinylována. Není mi však jasné, proč autorka v komentáři (str. 30) uvádí konkrétní hodnoty MIC a IC_{50} a v publikaci uvádí, že *N*-sukcinylochitosan nebyl testován (NT). Konjugáty *N*-sukcinylochitosanu s antituberkulotiky mají antimykobakteriální účinnost vyšší, ale nakolik se jejich antimykobakteriální aktivita a toxicita liší od volných antituberkulotik, nelze posoudit (hodnoty pro pozitivní kontroly nejsou uvedeny).

- V části 4 – *Modifications of antimycobacterial drugs* a Práci IV je prezentována standardní farmaceuticko-chemická problematika, v níž bohužel množství syntetické práce a biologických testů nebylo korunováno zajímavými biologickými výsledky. Tato situace je při hledání nových léčiv zcela běžná a není vinou autorky, že nebyla nalezena sloučenina výrazně výhodnější než v praxi používaná antituberkulotika.

Po formální stránce je práce sepsána poměrně pečlivě, ale větší pozornost mohla být věnována odstranění typografických nedostatků, např. nejsou rozlišovány pomlčky a spojovníky. V částech, kde se autorka opírá o dříve publikované práce je angličtina dobrá, v částech, kde se musí vyjadřovat samostatně, se již vyskytuje více chyb, např. nesprávný pořádek větných členů, dva záporné v jedné větě, zástupný podmět *there* je používán i v případě, že věta má podmět vlastní, není rozlišováno gerundium a podstatné jméno slovesné.

I přes uvedené připomínky splňuje disertační práce Mgr. Evy Vavříkové požadavky kladené na kvalifikační práce tohoto typu. Je třeba ocenit skutečnost, že autorka samostatně prováděla nejen syntézy sloučenin, ale také hodnocení jejich cytotoxicity. Disertační práci doporučuji k obhajobě.