

Posudok na doktorskú dizertačnú prácu Mgr. Barbory Janúšovej “Vliv derivátů aminokyselin a ceramidů na bariérovou funkci kůže”

Celkové zhodnotenie dizertácie:

1. **Téma dizertačnej práce** je aktuálna a mimoriadne zaujímavá. Štúdium bariérových vlastností kože a najmä *stratum corneum* je zaujímavé nielen z farmaceutického, ale zo všeobecne prírodovedného hľadiska. Optimálnou stratégiou v tomto štúdiu je testovať, ako vplývajú rôzne látky na tieto vlastnosti a hľadať vzťahy medzi ich účinkom, štruktúrou a zmenami štruktúrnych a dynamických parametrov, ktoré indukujú v cieľovom objekte. Získané poznatky môžu mať dôležité praktické aplikácie, napríklad pri príprave mnohých topických liekových foriem, ale aj pri hľadaní nových liečiv použiteľných na liečenie niektorých patologických stavov kože. Školiteľské pracovisko a školiteľka doktorandky dosahujú v takomto výskume dlhoročne vynikajúce výsledky. Tématicky dizertácia dobre zapadá do tohto smerovania.
2. **Cieľ dizertačnej práce** je jasne uvedený na str. 11 – výskum účinkov ceramidov a modulátorov bariérovej funkcie kože na kožnú bariéru a osvetlenie vzťahov medzi ich štruktúrou a účinkom. Motiváciou je získať poznatky, ktoré môžu prispieť k efektívnejšiemu navrhovaniu štruktúr kožných modulátorov s nízkou toxicitou a dermálnou dráždivosťou vhodných pre klinické aplikácie, resp. analógov ceramidov vhodných pre liečbu kožných ochorení. Doktorandka v ďalšom tento globálny cieľ podrobnejšie špecifikuje v čiastkových cieľoch: 1. Deriváty aminokyselín ako akceleranty transdermálnej permeácie, 2. Vplyv dĺžky acylového reťazca ceramidov na permeabilitu modelových membrán a štúdium ich termotropného chovania, 3. Deriváty aminokyselín ako látky schopné regenerovať poškodenú kožnú bariéru. Dizertácia jasne demonštruje, že stanovené ciele boli splnené.
3. **Metódy použité v dizertácii** sú náročné. Doktorandka venuje značný priestor popisu možných aplikácií infračervenej spektroskopie s Fourierovou transformáciou na štúdium *stratum corneum* v úvodnej časti dizertácie, v ďalších častiach ju úspešne používa. Okrem tejto bezosporu náročnej fyzikálne-chemickej metódy však použila celú radu ďalších experimentálnych metód, ktoré sú nemenej náročné. Spomením námatkou FT NMR spektroskopiu, hmotnostnú spektrometriu, diferenčnú skenovaciu kalorimetriu, HPLC, merania dermálnej elektrickej impedancie, náročné štatistické metódy vyhodnocovania výsledkov. Kľúčovým bolo samozrejme použitie Franzovej difúznej cely v permeačných experimentoch. Hoci sa táto metóda zdá byť jednoduchá, jej reprodukovateľnosť a presnosť v značnej miere závisí od majstrovstva experimentátora. V dizertačnej práci sa ale testuje napr. aj bunková a dermálna toxicita študovaných látok, aktivity kaspáz z hľadiska proapoptického účinku akcelerantov. Mimoriadne vysoko hodnotím nielen použitie všetkých týchto metód, ale aj ich zladenie a nevyhnutnú koordináciu.
4. **Zásadné nové výsledky dizertácie** dôležité pre ďalší rozvoj vedy sú predovšetkým výsledky komplexného štúdia dodecylesterov aminokyselín (prolín, sarkozín, alanín, β -alanín a glycín) s kratším acylovým alebo etylovým substituentom na amínoskupine (tzv. jednoreťazcové akcelerátory), resp. s dlhým 12 uhlíkatým reťazcom na tejto skupine (tzv. dvojreťazcové akcelerátory). Doktorandka pripravila 24 derivátov, vrátane L a D enantiomérov derivátov prolínu a alanínu, vyčistila ich, charakterizovala teplotami topenia, NMR a IČ spektroskopiou a hmotnostnou spektrometriou, výpočtom logP, a v prípade chirálnych zlúčenín optickou otáčavosťou. Testovaním urýchľovacej aktivity pripravených akcelerantov ako najúčinnější sa ukázal byť jednoreťazcový derivát so skratkou L-Pro2 (N-acetyl derivát dodecylesteru prolínu), aktivita sa významne nelíšila od jeho D-enantioméru; dvojreťazcové akcelerátory však mali podstatne nižšiu aktivitu. Výsledky IČ spektroskopie, predovšetkým posun a šírka metylénových valenčných vibrácií (s aj as), naznačili zmeny v konformácii lipidových reťazcov – nárast výskytu *gauche* konformérov – pri interakcii L-Pro2 s lipidmi *stratum corneum*, čo indikuje možný

mechanizmus účinku. Testy *in vitro* aj *in vivo* na potkanoch ukázali, že L-Pro2 by mohol byť vhodným kandidátom na klinické použitie vzhľadom na vysokú aktivitu, reverzibilný účinok a nízku toxicitu. Doktorandka píše, akým smerom by sa mali testy v ďalšom uberať. Vzhľadom na moje vlastné profesionálne zameranie sa mi okrem štúdia derivátov aminokyselín veľmi páčilo skúmanie termotrónneho chovania modelových membrán SC pomocou kalorimetrie a IČ spektroskopie kombinované s permeačnými experimentami s modelovými membránami vytvorenými na póroch polykarbonátových filtrov.

5. **Publikačná činnosť** doktorandky je bohatá. Výsledky dizertácie publikovala ako prvá autorka v 1 práci v kvalitnom časopise s vysokým impact faktorom, druhú prácu má v recenznom pokračovaní. Bola aj prvou autorkou 7 príspevkov na konferenciách. Ako spoluautorka sa podieľala na 5 ďalších kvalitných časopiseckých publikáciách, všetko v rozmedzí rokov 2009-2011. Považujem to za obdivuhodný výkon.

Spracovanie dizertačnej práce:

Rozsah dizertácie je primeraný (133 strán), vyvážený je rozsah jednotlivých hlavných kapitol, ktoré po globálnom úvode odrážajú postupnosť čiasťkových cieľov. Takéto členenie vedie k tomu, že sa s každou hlavnou kapitolou dostávame k lokálnemu úvodu, materiálu a metódam, výsledkom a diskuzii, celkovo tri razy podľa jednotlivých čiasťkových cieľov. Záver sumarizuje získané výsledky a čiastočne opakuje diskuziu. Dizertácia je napísaná v češtine, je čtivá a text svedčí o kvalitných formulačných schopnostiach autorky. Ako staromilcoví mi ovšem mierne prekáža „molekulární“ namiesto „molekulový“, nepáči sa mi tiež, že molekuly by mali mať hlavu, i keď len polárnu. Mám aj výhrady k termínu „tepelný tok“ (str. 81), nemala by sa skenovacím kalorimetrom merať tepelná kapacita? Doktorandka v zozname literatúry cituje 209 pôvodných publikácií; čo svedčí o jej dobrej sčítanosti a schopnosti selektovať podstatné informácie. Formát zoznamu literatúry (tzv. úplné citácie) sa príkladne dodržiava. Na rozdiel od slovenských zvyklostí chýba zoznam tabuliek a obrázkov. V prílohách k dizertácii sú publikácie doktorandky v angličtine, jedna zverejnená, druhá zaslaná do redakcie. Grafická úprava dizertácie je výborná.

Otázky:

1. Popíšte bližšie tzv. roztvorenú a vlásenkovú konformáciu lipidov (str. 21).
2. Aké boli kritické micelové koncentrácie pripravených derivátov aminokyselín? Boli väčšie či menšie ako 1 hm. % v aplikovaných suspenziách teofylínu alebo hydrokortizónu?
3. Cyklovali ste zohrievanie/chladenie modelových membrán pri DSC meraniach? Ak áno, aký bol výsledok? Ak nie, prečo?
4. Predpokladáte objemovú alebo laterálnu separáciu fáz v experimente s výsledkami na obr. 33?
5. Aké boli chyby teploty resp. intenzity na Obr. 42 na str. 91?
6. Ako sa mení rozdeľovací koeficient s dĺžkou acylu u študovaných ceramidov?

Záver:

Predložená práca spĺňa podmienky kladené na dizertačnú prácu. Doktorandka preukázala dizertačnou prácou, že zvládla metodiku vedeckej práce a že je schopná samostatne tvorivo vedecky pracovať. Získala nové poznatky dôležité pre ďalší rozvoj vedy. Súhlasím, aby bol doktorandke po úspešnej obhajobe dizertačnej práce udelený akademický titul "philosophiae doctor" v študijnom odbore Bioorganická chémia.

V Bratislave, 4. 8. 2012

Prof. P. Balgavý, CSc.
Farmaceutická fakulta UK v Bratislave