

Posudok oponenta na dizertačnú prácu

„Studium vlivu hydroxylace ceramidů na permeabilitu a mikrostrukturu modelových lipidových membrán“

autor Mgr. Andrej Kováčik

Mgr. Andrej Kováčik vypracoval dizertačnú prácu na Katedre organické a bioorganické chémie, Farmaceutickej fakulty Karlovej Univerzity, v skupine Skin Barrier Research Group pod vedením prof. PharmDr. Kateřiny Vávrovej, PhD. Dizertačná práca má netradičné členenie, ktoré je v súlade s Vnútrotným predpisom č. 180e/2017, čl. 17, bod 3. Dizertačný spis predstavuje šesť kapitol: 1. kapitola, Úvod a ciele práce, začleňujú študovanú problematiku do kontextu výskumu a autor špecifikuje ciele dizertačnej práce. Druhá a tretia kapitola sa venuje základnej problematike ľudskej kože, jej stavbe, štruktúre a usporiadaniu lipidov kožnej bariéry. Experimentálne metódy pre štúdium modelových membrán kožnej bariéry sú v krátkosti charakterizované vo štvrtjej kapitole. Piata kapitola predstavuje súhrnné komentáre k publikovaným prácam, ktoré tvoria prílohu dizertačnej práce. Záver (šiesta kapitola) sumarizuje dosiahnuté výsledky vzhľadom na stanovené ciele. Text je spracovaný kompaktne, s kvalitnou grafickou úpravou. Citačné odkazy predstavujú 190 literárnych zdrojov. Prílohu tvorí 5 publikovaných prác autora, v časopisoch v sumárnom IF 19.865, a jeden rukopis v recenznom konaní. V štyroch prácach je Mgr. Kováčik prvým autorom.

Aktuálnosť zvolenej témy: Témou dizertačnej práce bolo pripraviť a študovať bariérové vlastnosti ceramidov hydroxylovaných v dvoch polohách reťazca (hydroxylová skupina v C-4 sfingoidnej bázy tzv. fytoceramid a C-6 tzv. 6-hydroxyceramid). Prítomnosť 6-hydroxyceramidov v epidermis bola objavená len koncom minulého storočia a ich spojitosť s kožnými chorobami je predmetom vedeckých diskusií a štúdií. 6-hydroxyceramidy nie sú komerčne dostupné. Zvolená téma je náročná, aktuálna a výskum v danej oblasti žiadúci.

Ciele práce a ich splnenie: Hlavným cieľom práce bolo štúdium vplyvu hydroxylácie ceramidov na bariérové vlastnosti a mikroštruktúru modelových lipidových membrán kožnej bariéry. Syntéza fyziologických 6-hydroxyceramidov s dlhým a ultra-dlhým acylovým reťazcom je predmetom 2 publikovaných prác v SCI časopisoch (sumárny IF 9,687). Permeabilita a vplyv C-6 hydroxylovaných ceramidov na mikroštruktúru dvoch rozdielnych modelových systémov kožnej bariéry sú predmetom ďalších dvoch prác publikovaných v roku 2017 v Langmuir

a Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes. Ďalšia práca, rukopis v recenznom konaní, venuje pozornosť vzťahu štruktúra a účinok pri zmene stereochemie v polárnej časti ceramidu. Ciele dizertačnej práce boli splnené a publikačné výstupy vysoko prevyšujú požiadavky kladené na tento typ práce.

Zvolené metódy spracovania: Okrem samotných syntéz a charakteristík pripravených látok, boli vyšetrované biofyzikálne vlastnosti modelových systémov kožnej bariéry. Prášková röntgenová difrakcia bola použitá na stanovenie mikroštruktúry. Infračervená spektroskopia (FT IR) na štúdium usporiadania acylových reťazcov a fázových prechodov v systémoch. Priepustnosť lipidových membrán bola študovaná pomocou Franzových difúzných ciel a meraním elektrickej impedancie.

Dosiahnuté výsledky a prínos DP: Za najvýznamnejší výsledok a prínos k súčasným poznatkom v tejto oblasti bezpochyby patrí syntéza 6-hydroxyceramidov. Modelové membrány pripravené zo zmesi hydroxylovaných ceramidov v polohe 6 (Cer NH), mastných kyselín, cholesterolu a cholesterol-sulfátu vykazujú priepustnosť pre vodu aj lipofilné látky, ale vykazujú rezistenciu pre transport iónov či malé polárne molekuly. Štúdium vplyvu hydroxylácie ceramidov v dvoch polohách (C-4 sfingoidnej bázy a C-6 tzv. 6-hydroxyceramid) a zistené rozdiely v mikroštruktúre a permeabilite naznačujú rozdielne funkcie molekúl v epidermis. Ďalšie získané výsledky poukazujú na dôležitosť stereochemie v polárnej časti molekuly ceramidu. Získané výsledky prispievajú k pochopeniu významu vzťahu štruktúra – účinok ceramidov v kožnej bariére.

Otázky:

V práci Školová a kol. Biochim. Biophys Acta 1859 (2017) 824 – 834 ste identifikovali v modelovom systéme Cer NP/LIG/Chol/CholS koexistenciu až štyroch lamelárnych fáz. Ako si predstavujete takéto usporiadanie?

V tej istej práci, ako aj v práci Kováčik a kol. Langmuir 33 (2017) 2890 – 2899 boli lipidové zmesi nanosené na podložky, homogenizované zohrievaním a následným ochladením. Potom boli hydratované pri vlhkosti 30 % počas 24 hodín. Zaujímalo by ma, prečo bola hydratácia robená práve pri 30 %. Aký je pomer mol H₂O/mol lipid pri takejto hydratácii?

Cholesterol (Chol) predstavuje významnú súčasť lipidovej matice SC. Časť Chol predstavuje samostatnú fázu. Zaoberali ste sa otázkou, aký obsah Chol je včlenený do lipidovej matice a kde je Chol lokalizovaný v modelových systémoch vo vašich experimentoch?

Zhodnotenie: Dizertačná práca Mgr. Andreja Kováčika predstavuje ucelenú štúdiu vzťahu štruktúry a účinku vybraných ceramidov pri ich zabudovaní do modelových membrán kožnej bariéry. Výsledky štúdia boli publikované v kvalitných zahraničných časopisoch. Úroveň práce a publikačné výstupy vysoko prevyšujú požiadavky pre doktorandské štúdium. Ako vyplýva z CV, Mgr. Kováčik je spoluautorom 13 pôvodných vedeckých prác publikovaných v r. 2014 – 2017 a ďalšie dve práce sú v recenznom konaní. Publikačné aktivity a Hirschov index 4 svedčia, že autor vie samostatne vedecky pracovať.

Záverom konštatujem, že dizertačná práca v plnom rozsahu spĺňa náležitosti požadované vnútornými predpismi Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové, Karlovej Univerzity v Prahe. Mgr. Andrej Kováčik zvládol danú problematiku a získal nové, originálne výsledky ktoré prispievajú k poznatkom v danom vednom odbore.

Dizertačnú prácu doporučujem k obhajobe a po úspešnom obhájení práce navrhujem udeliť Mgr. Andrejovi Kováčikovi vedecko – akademickú hodnosť PhD.

V Bratislave, 19.11. 2017