INSTITUTE OF BIOPHYSICS
ACADEMY OF SCIENCES OF THE CZECH REPUBLIC
KRALOVOPOLSKA 135, BRNO 612 65, CZECH REPUBLIC

Posudek oponenta na disertační práci **Ing. Dagmar Čožíkové**

Analýza radioaktivně značené hyaluronové kyseliny a jejich metabolitů v biologickém materiálu

Hlavním úkolem předložené disertační práce bylo připravit radioaktivně značenou kyselinu hylauronovou o různé molekulové hmotnosti a zjisti možnost využití takto značené kyseliny hyaluronové pro stanovení distribuce po perorálním a intravenózním podaní. K tomuto účelu bylo optimalizováno několik metodologických přístupů včetně chemické syntézy, biosyntézy a přímého značení využívajících různých radioaktivních prvků. Bylo optimalizováno velké množství různých analytických přístupů pro podrobnou charakterizaci vzniklých derivátů kyseliny hyaluronové. Tyto metodiky pak byly také využity pro podrobné zkoumání stability získaných derivátů jednak v čase a v různém prostředí. Nakonec byly provedeny biodistribuční studie, čímž bylo prokázáno úspěšné splnění cíle předložené disertační práce.

Z práce vyplývá, že výsledky práce jsou velmi unikátní, a ve své komplexnosti neporovnatelné s pracemi doposud publikovanými jinými autory. Aktuálnost a celková vědecká hodnota výsledků byla potvrzena jejich opublikováním v kvalitním impaktovaném časopise na základě nezávislého recenzního řízení. Autorka výsledky aktivně prezentovala na několika tuzemských a mezinárodních konferencích.

Text práce je v českém jazyce, stylistická úroveň je dobrá. Práce je členěna na úvod, cíl práce, teoretickou část, experimentální část a kapitolu výsledky s diskuzí. Stručně avšak výstižně je vypracována úvodní část zabývající se biologickými vlastnostmi, biodistribucí, farmakokinetikou a využitím kyseliny hyaluronové v medicíně a kosmetice (kapitoly 3.1., 3.2., 3.6. a 3.7). Do větších podrobností jsou zpracovány další kapitoly týkající se izolace kyseliny hyaluronové, metod charakterizace chemických a fyzikálních vlastností kyseliny hyaluronové a kapitola 3.5. popisující metody radioaktivního značení kyseliny hyaluronové. Tyto kapitoly však působí částečně nesourodě, uváděné metody jsou popisovány z různých pohledů s jinou úrovní uváděných detailů. Není v úvodu např. jasné, proč se věnuje tolik pozornosti metodám pro stanovení degradačních produktů kyseliny hyaluronové, oproti jiným metodám, které jsou přímo definovány v cílech práce.

Celkově však v úvodní teoretické části autorka jasně prokazuje hlubokou znalost studované problematiky a dobrou orientaci v relevantní literatuře.

V experimentální části jsou velmi podrobně popsány metodiky, včetně logického postupu jejich optimalizace. Opět ovšem jsou některé části podrobněji rozpracovány oproti ostatním. Celkově však z této části vyplývá, že autorka úspěšně zavedla a využívala celou řadu náročných technik a experimentálních přístupů.

Výsledky jsou velmi podrobně popsány s kvalitními grafy s přehlednými popisky. Za nedostatek lze považovat pouze minimální přítomnost diskuze v této části práce. Bylo by vhodné získané výsledky více porovnávat a diskutovat s výsledky jiných autorů. Zpracovávaná tématika je sice unikátní a relevantní literatury není příliš, ale výsledky měly být diskutovány alespoň s ohledem na literaturu prezentovanou v úvodní části.

Pozornosti uniklo několik formálních chyb. Opakovaně jsou používány termíny, pro které byly definovány zkratky (např. reaktivní formy kyslíku). Je používána různá terminologie pro stejné popisované mechanismy či principy - např. získaní značené kyseliny hyalurovové přímo z mikroorganismů inkubovaných v přítomnosti radioaktivně značených prekurzorů je jednou nazýváno jako „Biochemická syntéza“, v další části „Biosyntéza“ a kapitola pojednávající o experimentálním postupu k této metodě je nazvána „Příprava a stanovení aktivity ^{14}C-HA“

<u>Dotazy a připomínky oponenta</u>:

Vzhledem ke skutečnosti, že výsledky byly opublikovány v kvalitních impaktovaných časopisech a tedy podrobeny recenznímu řízení, které je zárukou, že výsledky jsou skutečně originální a cenné pro mezinárodní vědeckou komunitu, následující připomínky jsou spíše námětem do diskuse.

1 - Proč nebylo testováno značení radionuklidem tritiem, používaným pro značení kyseliny hylauronové jinými autory?

2 - V úvodní části na str. 16. je uvedeno, že poločas rozpadu kyseliny hylauronové v krvi je v rozmezí několika minut. Jak tento obecně přijímaný předpoklad koreluje se získanými daty autorky a jak lze případné rozdíly vysvětlit?

3 - Byla velmi podrobně testována stabilita značené kyseliny hylauronové in vitro v různých médiích. Jak jsou získané výsledky porovnatelné s údaji publikovanými jinými autory?

4 – V rámci charakterizace stability a biodistribuce značené kyseliny hylauronové je rozdělována detekce frakce nízko a vysokomolekulární a to i v případě, kdy počáteční

vzorek byla 8-10 kDa (např. tabulka 12). Kyselinu hyaluronovou o této molekulové hmotnosti lze označit již jako nízko molekulární. Jak si lze vysvětlit možnost detekce vysokomolekulární značené kyseliny hylauronové po aplikaci tohoto vzorku?

5- Je možné vysvětlit rozdílné výsledky oproti práci Balogha a kol. popisující výskyt radioaktivně značené kyseliny hyaluronové po peroráním podání v kloubech využitím různých metodických přístupů s jinou citlivostí detekce? Která z použitých metod by měla být citlivější?

Závěr

Dizertantka prokázala tvůrčí schopnosti, teoretickou připravenost, schopnost analytického myšlení při plánování experimentů, znalost náročných a specializovaných metodik i schopnost korektně interpretovat dosažené výsledky. Dizertantka splnila vytčené cíle práce. Výsledky významně obohatily současné pochopení biodistribuci perorálně a intravenózně aplikované kyseliny hyaluronové o různé molekulové hmotnosti. Disertační práce po všech stránkách splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru. Uvedené skutečně drobné připomínky spíše formálního rázu nikterak nesnižují vysokou odbornou úroveň předložené práce.

Vzhledem k výše uvedenému doporučuji přijetí práce k obhajobě

V Brně 9. července 2012

Lukáš Kubala, Ph.D.
Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i.
IČ: 68081707
Královopolská 135
612 65 Brno
Tel: +420 - 541 517 117
Fax: +420 - 541 211 293
E-mail: kubalal@ibp.cz