

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Oddělení studijní a vědecké agendy,
Studentská 573
532 10 Pardubice

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Využitie kombinácie gélovej permeačnej chromatografie s rozptylovým fotometrom pre charakterizáciu molekulárnej štruktúry a štúdium vlastností kyseliny hyaluronovej

Disertant: Ing. Martina Hermannová

Školitel: Prof. Ing. Štěpán Podzimek, CSc.

Studijní program: P2833 Chemie a technologie materiálů

Vědní obor: 2808V006 Technologie makromolekulárních sloučenin

Zpracoval: Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra farmaceutické technologie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové

Úvod

Předložený spis má celkový rozsah 101 stran. Je zaměřen především na dokumentaci experimentálně zjištěných dat, jejich diskusi a na vyvození obecnějších závěrů z nich. Práce má rysy základního výzkumu i aplikovaného vývoje metod analýzy kyseliny hyaluronové a jejích solí. Teoretická část je široce pojatá, zahrnuje učebnicová fakta i speciální informace k řešenému tématu. Slouží pro podporu argumentace vhodnosti řešeného tématu a zvolené metodiky. Dokumentace výsledků experimentů zahrnuje 16 tabulek a 32 obrázků. Je připojen seznam 87 literárních zdrojů. Do práce jsou vloženy přílohy týkající se analýzy oligomerů a nízkomolekulárních polymerů kyseliny hyaluronové.

Seznam pěti spoluautorsky publikovaných vědeckých prací v impaktovaných časopisech a pěti příspěvků na symposiích je součástí spisu.

Aktuálnost řešené problematiky

Autorem a školitelem zvolená problematika je aktuální jednak z hlediska poznání vlastností roztoků polysacharidů, jednak z hlediska zdokonalování metod jejich analýzy. Kyselina hyaluronová není jen excipientem zvyšujícím viskozitu systémů a lokální hydrataci tkání, projevuje se také aktivně v interakci s biologickým prostředím. Adjuvantní působení tohoto polymeru má široké využití při formulaci farmaceutických a kosmetických preparátů. Správné hodnoty molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové souvisí nejen s kontrolou jakosti produktů, ale také se zpřesněním metod studia vlivu její molekulové hmotnosti na angiogenezi, metastázy nádorových buněk či mikrobu, a též na interakce s imunitním systémem.

Cíl disertační práce

Cílů práce je několik, jsou uvedeny na straně 10. V této části práce je v obecných rysech vyjádřeno, čeho měla disertantka v rámci svých experimentů dosáhnout. Hlavním cílem bylo srovnání dat týkajících se molekulové hmotnosti získaných různými metodami analýzy vodných roztoků kyseliny hyaluronové. Byly použity různé vzorky kyseliny hyaluronové připravené s odstupňovanou molovou hmotností v relevantním rozmezí hodnot.

Práce je patrně součástí výzkumného projektu, který souvisí s rozšiřováním sortimentu a zkvalitňováním produkce mateřské firmy Holding Contipro Group.

Zvolené metody práce

Metody experimentálních prací jsou adekvátní zadaným nebo zvoleným cílům. Disertantka využila své zkušenosti, zručnost při práci v chemické laboratoři s možnostmi kolegů z několika pracovišť a také informace získané studiem literárních pramenů. Předložená práce se vyznačuje pestrostí metodik analýzy roztoků polymerů. Pro jejich zvládnutí si musela autorka práce osvojit teoretické základy měření molové hmotnosti a dalších souvisejících parametrů roztoků kyseliny hyaluronové a jejích solí a v dostatečné šíři se seznámit s možnostmi přístrojové techniky.

Výsledky práce

Za hlavní výsledky považuje oponent získání nových a rozšíření dosavadních poznatků týkajících se řízené depolymerizace kyseliny hyaluronové, nalezení optimálních podmínek pro stanovení molové hmotnosti metodou GPC-MALS, potvrzení nevhodnosti jiných biopolymerů jako standardů pro kalibraci, prokázání správnosti výsledků měření metodou MALS srovnáním s měřením ultrafiltrací a frakcionací tokem v poli, prokázání vhodnosti metody MALS pro nízkomolekulární polysacharidy s M_w pod 5000 g/mol. Spojením metod GPC-MALS-VIS byly získány výsledky vedoucí k vyslovení zajímavé hypotézy o větvení řetězce kyseliny hyaluronové vyvolaném procesem izolace biotechnologického produktu.

Přednosti disertační práce

Práce zahrnuje širokou škálu přístrojových metod a metodik laboratorní práce souvisejících se stanovením molární hmotnosti vysokomolekulárních i nízkomolekulárních polysacharidů a určením velikosti náhodného klubka. Z hlediska provedení experimentů včetně zvládnutí přístrojové techniky nebyly nalezeny nedostatky. Výsledky jsou zpracovány na velmi dobré grafické úrovni a prezentovány jednoznačně, jasně a srozumitelně. Zvolené metodické přístupy mohou sloužit při případném pokračování v řešení tématu nebo pro případné navazující studie.

Nedostatky disertační práce

Nejasnosti, nedokonalosti a chyby, které jsou v předložené práci, jsou dílčího charakteru, některé z nich jsou diskutabilní s možností jejich obhajoby. V práci nebyl nalezen nedostatek, který by zásadním způsobem ovlivnil podstatu předložené disertační práce.

FORMÁLNÍ NEDOSTATKY

- Práce je velmi pečlivě zpracovaná, oponent našel velmi malý počet překlepů a formálních nedostatků. Za zmínku stojí uvedení zkráceného firemního názvu HEMA jako sorbentu pro GPC.

- Specifická viskozita je frakční změna viskozity vyvolaná přidáním polymeru k rozpouštědлу, nikoliv naopak. Proto zápis vzorce (39) na s. 32 jako podílu viskozity samotného polymeru a viskozity jeho rozpouštědla je věcně nesprávný. Polymer v tavenině má stejné parametry jako v roztoku za přísně vymezených pseudoideálních podmínek. O tom disertantka v předložené práci své znalosti prezentuje, proto je možno tento nedostatek pokládat za formální.
- Na s. 39 je popsáno rozpouštění kyseliny hyaluronové pomocí dispergačního zařízení ultraturrax. Ultra-Turrax je chráněný název firmy IKA, v současnosti existuje mnoho jiných firem, které vyrábějí homogenizátory založené na stejném principu. Název homogenizátoru daného typu, který doporučuje firma Ika je vysokorychlostní dispergátor. Název Ultra-Turrax zahrnuje take zařízení typu koloidního mlýna.
- Na s. 62 je podle mínění oponenta velmi důležitá tabulka. Není však číslována.
- Na s. 84 je na obr. 30 závislost dynamické viskozity na rychlostním spádu uvedená jako toková křivka. Podle klasických zvyklostí by se mělo jednat o viskozitní křivku. Toková křivka, neboli rheogram, je závislost posuvného napětí (F/S) na rychlostním spádu (dv/dr). I v odborné literatuře jsou však oba termíny hojně zaměňovány.
- Na s. 91 je konstatování, že stanovení vnitřní viskozity je vyžadováno nejen českým, ale také evropským lékopisem. Tvrzení je věcně pravdivé, v tuzemsky platném lékopisu je zkouška požadována již od platnosti ČSL 3 z roku 1970. Formálně je však vyjádření nepřesné, protože český lékopis je v podstatě překladem evropského. To znamená kodifikaci nejdříve v evropském a v několikaměsíčním odstupu v českém.

ODBORNÉ NEDOSTATKY

Odborné nedostatky oponent nenalezl. Některé výsledky uvedené v hodnoceném spisu byly publikovány v kvalitním impaktovaném periodiku s náročnou recenzí.

PROBLÉMOVÉ OTÁZKY K DISKUSI

- Oponenta by zajímalo, jestli byl nějaký důvod využít dvou metod rozpouštění hyaluronanu před jeho enzymatickou degradací (s. 39) – na magnetické míchačce a pomocí vysokorychlostního dispergátoru a proč byl použit hyaluronan kosmetické kvality.

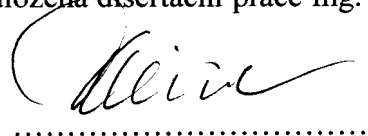
- Oponent by se chtěl paní ing. Hermannové zeptat, proč byly při demonstraci vlivu koncentrace vzorku na deformaci píku na s. 61 a vlivu koncentrace vzorku na naměřené hodnoty M_w (s. 62) použity dva různé hyaluronany s různými hodnotami M_w .
- Je možno se vyjádřit k původnosti zjištěné závislosti gyračního poloměru různých biopolymerů na jejich molové hmotnosti (s. 65, obr. 16)?
- Existuje mnoho prací o tom, že kyselina hyaluronová i při nízkých koncentracích tvoří agregáty, v jejích roztocích se mohou některé segmenty uspořádat do konformace dvojité šroubovice intramolekulárně i intermolekulárně. Může se k těmto jevům disertantka vyjádřit?
- Je možno vyloučit desacetylaci při dlouhodobém uchovávání roztoků kyseliny hyaluronové v kyselém prostředí, tak jak je tomu u chitinu?
- Byla kompozice různých kationtů jako protiiontů dostatečně standardní?
- Existují nějaké informace o vlivu průchodu hyaluronanu GIT na jeho molekulovou hmotnost?

ZÁVĚR

Inženýrka Martina Hermannová vypracovala přehlednou kvalifikační práci. Její podstata je v experimentu, který se vyznačuje při vysokém stupni specializace značnou metodickou šíří. V práci je mnoho výsledků, které jistě budou sloužit jako podklad pro další pokračování v řešení teoreticky zajímavého a z praktického hlediska významného tématu.

Disertantka splnila cíl práce předložený školitelem a školícím pracovištěm. Prokázala schopnost práce s odbornou literaturou, schopnost využívat poznatky získané z literárních podkladů, experimentálně je ověřovat, výsledky experimentů věcně zhodnotit a vyvodit z nich adekvátní závěry. Splnila tak podmínky kladené na disertační práci.

Na základě výše uvedeného doporučuji, aby byla předložená disertační práce Ing. Martiny Hermannové přijata k obhajobě.



Doc. RNDr. Milan Dittrich, CSc.

V Hradci Králové, 15. července 2010

Oponentní posudek disertační práce Ing. Martiny Hermannové na téma „Využití kombinace gelové permeační chromatografie s rozptylovým fotometrem pro charakterizaci molekulové struktury a studium vlastností kyseliny hyaluronové“

Předložená disertační práce se zabývá aktuálním tématem charakterizace biopolymerů prostřednictvím nejmodernější techniky užívané v makromolekulární praxi. Členění práce odpovídá standardním požadavkům a celkově vytváří velmi ucelený obraz o dané problematice.

V úvodní teoretické části je stručně uvedena teorie pro stanovování molekulárně hmotnostních distribucí polymerů s vysvětlením mechanismů a instrumentálních technik. Výstižně jsou srovnávány alternativní techniky vhodné pro analýzu zvoleného biopolymeru. Experimentální část představuje samostatnou přípravu studovaných vzorků oligomérů kyseliny hyaluronové, optimalizaci zvolených separačních technik a jejich vzájemné porovnání. V celé práci jsou pečlivě uváděny citace a odkazy na práce, které se podobnou problematikou zabývaly v nedávné minulosti a dostatečně kriticky jsou s nimi porovnávány získané výsledky. Úspěšně byla použita technika GPC –MALS, která poskytuje absolutní hodnoty molekulárně hmotnostních distribucí. Správnost takto získaných výsledků byla porovnána s alternativními metodami.

Z výše uvedeného popisu je patrné, že se jedná o práci velmi rozsáhlou, zahrnující velké množství provedených experimentů s následným vyhodnocením a diskusí získaných dat. Výsledky byly několikrát publikovány v renomovaných časopisech a prezentovány na odborných konferencích i v zámoří, což potvrzuje aktuálnost studované problematiky i zodpovědné zpracování a prezentaci shromážděných výsledků.

Po obsahové stránce nemám k práci zásadních připomínek. Mé poznámky a dotazy se týkají spíše formálního provedení.

1. Co bylo myšleno „robustností“ ve druhém bodu na straně 10? Byla tím myšlena odolnost vůči vnějším vlivům při analýze nebo vyhledání vhodných parametrů pro analýzu bez vlivu na konečný výsledek?
2. Co v biochemii znamená „poliferácia a diferenciacia“ zmiňovaná na straně 13?
3. Od strany 14 je mnohokrát uváděno slovo „softvér“. Myslím, že v této formě se jedná o zkomoleninu anglického slova „software“.
4. Na straně 18 je v poslední větě uvedeno, že intenzitu světla vyjadřuje „nadbytečný Rayleigho poměr“. Co se myslelo slovem nadbytečný.

5. Na straně 21 končí předposlední odstavec slovy „...napětí RI detektoru eluujícího vzorku baseliny“ Slovo „baselina“ se zdá být použita nevhodně.
6. Na straně 24 jsou shrnuty hodnoty dn/dc pro kyselinu hyaluronovou. Chci se zeptat, zdali je tato hodnota na teplotě závislá, či nezávislá.
7. Na straně 27 je na desátém řádku zdola nesrozumitelná věta „...tok mobilnej fázy len vo vertikálnym smerom...“
8. Na straně 32 se u vzorce (33) píše, že jednotka Poise je starší. Spíše je více užívána v USA než v Evropě.
9. Od strany 37 jsou specifikovány užívané chemikálie. Vše je jasné a přehledné, pouze Německo není státní útvar. Doposud se uvádí NSR.
10. Na straně 39 je popisován degradační postup kyseliny hyaluronové a specifikován čas 1-240 minut. V této formě je pro čtenáře časová specifikace značně nejasná. Jak dlouhý degradační proces vlastně byl. Nebo byly vzorky odebírány v nějakých časových intervalech?
11. Na stejné straně je v předposledním odstavci specifikována kyselina hyaluronová „standadní molekulovou hmotností $1,3 \times 10^6$ g/mol. Jakou technikou byla tato standadní hodnota určena? Dále je napsáno, že dispegace byla prováděna pomocí zařízení ultraturrax nebo přes noc magnetickým míchadlem. Kdy a proč se volil odlišný způsob dispergace?
12. Na straně 44 se na konci předposledního odstavce píše o vzorcích s molekulovou hmotností zhruba 1×10^5 g/mol. Jaké rozmezí se myslí slůvkem „zhruba“.
13. Na straně 46 se píše, že dávkovaný objem Dextranu byl 100 mikrolitrů a kyseliny Hyaluronové 500 mikrolitrů. Proč je tak odlišný objem nástřiku?
14. Na straně 47 jsou popsány mobilní fáze a dále použitá kolona Luna NH₂. O jaký typ chromatografické separace se jednalo?
15. Na straně 49 jsou na konci prvního odstavce popisovány formy degradace kyseliny Hyaluronové. Chci se zeptat, zdali tato lehká degradovatelnost je jedním z důvodů k hojnému užívání této kyseliny ve farmaceutické praxi?
16. Na straně 50 je popisována kyselá hydrolýza pro přípravu oligomerů. Jakým způsobem je tato hydrolýza ukončena, aby byla zajištěna stabilita konečného produktu.
17. Na straně 54 je v přehledu mobilních fází užíván azid sodný. Z jakého důvodu je nutné jeho použití?

18. Na straně 57 je popisován výběr vhodné koncentrace dihydrogen fosforečnanu sodného. Není zde však zdůvodněno proč byla vybrána mobilní fáze H a ne I, když byly pozorovány podobné výsledky při jejich aplikaci.
19. Na straně 70 je porovnání výsledků F1FFF-MALS a GPC-MALS analýz. Kromě hodnot M_w je diskutována polydisperzita. Chci se zeptat jakých výsledků bylo dosaženo při určování číselných průměrů M_n ? Proč nejsou uvedeny též?
20. V tabulce 16 na straně 78 je shrnuta chromatografie oligosacharidů a uváděny výtěžky přibližně 30%. Proč jsou tak nízké a jak byly stanoveny.
21. Na stejné straně 78 je posun k vyšším vnitřním viskozitám vysvětlen nižší koncentrací soli a tím větší expanzí náhodného klubka KH. Jedná se o vlastní, tedy originální vysvětlení nebo jev popisovaný v literatuře?
22. Na straně 83 je napsáno, že „... v této práci jsem dosáhla kontinuální pokles a v celém rozsahu...“ Lépe by bylo říci, že tento pokles byl pozorován v celém rozsahu. Asi nebylo cílem tohoto jevu dosáhnout.
23. Na straně 85 je diskutováno možné větvení na řetězci KH. Chci se zeptat, zdali toto větvení může mít vliv na užité vlastnosti komerčně užívaných materiálů, či nikoliv?
24. V závěru se na straně 89 píše, že otestovaná metoda je lehce kontrolovatelná a využitelná ve výrobním měřítku. Má otázka zní, zdali je při výrobě KH užívána pro kontrolu výrobního procesu, či pro kontrolu konečných parametrů výrobků?

Závěrem konstatuji, že práce je dostatečně kvalitní a posouvá kupředu znalosti v dané oblasti. Předpokládám, že již nyní si popisovaná analytická technika razí cestu pro široké použití v biochemické a biotechnologické praxi. Tímto doporučuji oponovanou práci bez dalších připomínek přijmout k obhajobě.

V Pardubicích 28.7.2010



Ing. Martin Kaška Ph.D.

Posudek disertační práce Ing. Martiny Hermannové „Využitie kombinácie gélovej permeačnej chromatografie s rozptylovým fotometrom pre charakterizáciu molekulárnej štruktúry a štúdium vlastností kyseliny hyaluronovej“.

Cílem předkládané disertační práce byla příprava vzorků hyaluronanu o různé distribuci molekulových hmotností, tyto vzorky charakterizovat za pomoci několika konvenčních a méně konvenčních technik, získané výsledky porovnat a diskutovat možnosti jejich dalšího využití. Téma je aktuální a přínosné, výsledky práce se zdají být využitelné v průmyslovém měřítku, při standardní kontrole produktů i ve výzkumu a vývoji. Vytčené cíle byly splněny.

Práce je psána ve slovenském jazyce, je poměrně dobře čtivá, pokud mohu posoudit tak bez gramatických chyb, s minimálním počtem překlepů, nomenklatura je používána správně. Logické členění je voleno vhodně, v první části uvádí autorka informace k celé práci, definuje a přijatelně detailně také popisuje jednotlivé metody a přístupy. V této části je škoda, že se o něco více nezaměřila také na základní práce týkající se chemie a konformace hyaluronanu v roztoku od autorit v této oblasti jakými jsou například prof. Scott, prof. Kennedy, dr. Cowmanová atd. Nicméně, tato maličkost nijak významně nesnižuje vcelku dobrý formální dojem, jakým práce při čtení působí. Některé formální nedostatky, které lze vytknout, je například používání desetinné tečky místo čárky jak je zvykem při psaní textu v českém nebo slovenské jazyce, dále pak používání koncentrační jednotky „M“ místo „mol/l“ (v některých dalších částech je pak i „mol/L“), která není schválena IUPAC, dále pak nebyla studována kyselina hyaluronová, ale její soli.

Další část je věnována popisu samostatných experimentů, z kterého je patrné, že autorka je seznámena s celou škálou metod vhodných pro charakterizaci biopolymerů.

Výsledky a diskuze shrnují získané výsledky, které jsou zde uváděny ve formě tabulek a grafů (formálně opět na dobré úrovni). Zde bych si opět dovolil výtku - jsou-li data v grafu prokládána nějakou funkcí, je vhodné uvádět parametry proložení, hlavně pak korelační koeficient. V některých případech je statistická významnost uvedena v textu, pak to nutné pochopitelně není. Tato část disertační práce, dle mého soudu, obsahuje nejslabší článek a tím je diskuze získaných výsledků. Zatímco popis dat je velmi detailní, jejich vysvětlení a případná diskuze s ohledem na literární zdroje je poměrně slabá, na několika místech je odbyta pouze několika větami, přičemž s některými z nich se dá snadno polemizovat. Získaná data i některé přístupy se zdají být originální a proto by si určitě zasloužila větší pozornost. Některé konkrétní případy uvádím níže.

V poslední části je pak uvedena použitá literatura v počtu 87 prací, což je slabší průměr u tohoto typu práce, následovaná několika stranami příloh a seznamem prací autorky. Práce autorky zahrnuje 5 časopiseckých publikací, na nichž je Ing. Martina Hermannová uvedena jako spoluautorka a 7 příspěvků na konferencích.

Nyní uvádím několik poznámek a otázek, které mohou sloužit jako podklad k diskusi při obhajobě Ing. Martiny Hermannové.

1. strana 4 „Anotace“ i jinde – „objasnenie molekulárnej štruktúry tohto zaujímavého biopolyméru“ – v tomto bodě bych doporučoval být opatrnější, molekulární struktura hyaluronanu je známá přes 50 let, neměla autorka na mysli spíše konformaci nebo nadmolekulární strukturu? Pokud měla autorka na mysli větvení hyaluronanu, diskutované v bodě „9“ tohoto posudku, pak ani v tomto případě bych nevolil výše uvedenou formulaci.
2. strana 29, „...ultra vysokou molovou hmotnosťou (10^6 - 10^8 g/mol).“ Je tato hodnota pro hyaluronan reálná?
3. strana 40, sušení hyaluronanu probíhalo 6 hodin při 105°C . Je hyaluronan natolik stabilní, aby vydržel neporušený při těchto podmínkách? Dále pak, bylo sušení při 105°C efektivní, tj. byl získán opravdu suchý hyaluronan?
4. strana 50, neporozuměl jsem tvrzení: „Pre každé pH je z obrázku 8 vidieť lineárnu závislosť medzi $1/P_n$ a časom degradácie, čo naznačuje náhodný degradačný mechanizmus.“ Může toto tvrzení autorka dodatečně a detailněji vysvětlit?
5. strana 51, co bylo kriteriem pro tvrzení, že ideální doba degradace je cca 4 hodiny?
6. strana 57, pufrý „F“ až „I“ byly různě koncentrované roztoky dihydrogenfosforečnanu sodného a azidu sodného, opravdu bylo pH 7,5 u všech z nich nebo bylo nutné pH ještě upravovat?
7. strana 58, čím si vysvětlujete pokles hodnoty M_w při pH 6,5 proti pH 7-8?
8. strana 58, autorka vysvětluje pokles M_w s teplotou jako degradaci způsobenou „...strihom v HPLC systéme, ktorého pravdepodobnosť rastie s rastúcou viskozitou eluentu“. Existuje nějaká literární zmínka o tomto efektu v HPLC nebo je to vlastní experimentální zkušenost?
9. strana 85, tvrzení o větvení hyaluronanu jako vysvětlení pro pokles M-H parametru α . Podané vysvětlení se pochopitelně nedá zamítnout, nicméně se domnívám, že to nemusí být vysvětlení jediné nebo úplně správné. Uvažovala autorka i o jiných

možnostech spojených například se neidealitou roztoků hyaluronanu? Neidealita může být způsobena, mimo jiné, i tvorbou inter nebo intramolekulárních interakcí segmentů hyaluronanu přes vodní můstky (např. Průšová et al., 2010; Anal. Bioanal. Chem.). Jak autorka uvádí, Weissmann a Meyer (1954) možná připouštěli možnost větvení, ale je třeba si uvědomit, že zdrojem jejich hyaluronanu byl materiál extrahovaný z živočišných tkání, tudíž je pravděpodobné, že byl znečištěný kovalentní vazbou s některým z proteinů z ECM, tudíž větvení obsahoval. Autorčin hyaluronan byl zcela jiného původu a troufám si tvrdit, že i jiné čistoty. Jaká je Vaše představa o mechanismu a místě na kterém se hyaluronan větví? V jaké fázi výrobního procesu by k němu mohlo docházet? Pokud je toto tvrzení správné, pak se může jednat o komerčně využitelnou informaci. Byl bych také opatrný v tvrzení v poslední větě na straně 85, při tomto typu tvrzení se nelze opírat o citaci z roku 1949.

Výše zmíněné připomínky nijak významně neovlivňují dobrou úroveň práce, proto ji doporučuji k obhajobě, a po splnění všech nezbytných formalit a úspěšném obhájení práce i udělení titulu „Ph.D.“



V Brně dne 22.7.2010

doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.