

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Ing. Zuzany Bezákové

CHARAKTERIZÁCIA OLIGOSACHARIDOV A KRÁTKYCH POLYSACHARIDOV VZNIKNUÝCH ŠTIEPENÍM KYSELINY HYALURÓNOVEJ METÓDAMI KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE A ŠTÚDIUM KINETIKY ŠTIEPENIA KYSELINY HYALURÓNOVEJ

Disertační práce shrnuje především výsledky vývoje postupu přípravy a výroby preparátů kyseliny hyaluronové o nízké až velmi nízké molekulové hmotnosti. Produkty tohoto vývoje byly samozřejmě charakterizovány, mimo jiné kapalinovou chromatografií, stejně tak byla studována kinetika jejich přípravy, jinak má ale název práce omezující záběr a je poněkud zavádějící. Práce má klasickou strukturu, po krátkém úvodu následuje teoretická část věnovaná zejména poznatkům dosud publikovaným v literatuře. Těžiště práce spočívá v experimentální části a v části věnované prezentaci a diskusi výsledků. Krátký závěr shrnuje hlavní přínosy práce a nová zjištění získaná při vypracovávání zadaných úkolů. Hned zde bych ocenil jasný a cílený technologický náboj práce, který byl jejím základním smyslem a určujícím rámcem návrhu, realizace a zhodnocení experimentů.

Teoretická část podává velmi krátkou informaci o kyselině hyaluronové a o něco delší přehled postupů její přípravy, zejména přípravy forem nízkomolekulárních a oligosacharidových. Vzhledem k zaměření práce bych ale očekával hlubší a širší záběr rešerše, pominuty jsou otázky mechanismu i kinetiky různých štěpících procesů, přičemž alespoň to druhé je podstatné i pro práci technologického charakteru, tím spíše, když má kinetiku i v názvu. A právě vzhledem k názvu (a tedy zjevně i zadání) práce postrádám v této části informace o poznatcích z oblasti využití kapalinové chromatografie v charakterizaci hyaluronanu.

Část experimentální celkem dostatečně popisuje provedení jednotlivých experimentů, zejména tedy postupů štěpení vysokomolekulárního hyaluronanu. Výsledkově-diskusní část pak popisuje a rozebírá výsledky experimentů. Vzhledem k technologické podstatě práce vypadají experimenty rutinně, ale představují množství práce nezbytné k posouzení schůdnosti (zejména v plánované následné výrobě) řady nabízejících se postupů a k optimalizaci toho postupu, který se z přehledného průzkumu jeví jako nejnadějnější pro praktickou aplikaci ve výrobě. V této souvislosti bych chtěl zdůraznit, že doktorandka nezůstala jen u laboratorní činnosti a optimalizace, ale vrhla se i do pokusů poloprovozních. Tím práce tvoří hezký, uzavřený celek hlavní fáze technologického výzkumu. S návrhem a provedením experimentů lze souhlasit, nenalezl jsem však dostatek údajů o počtu opakování experimentů, statistickém zhodnocení, opakovatelnosti, nebo o významnosti rozdílů.

V závěru práce pak už opravdu nezbyvalo než shrnout, zopakovat hlavní výstupy experimentů a optimalizace. Jasně jsou identifikovány nové přínosy této práce, s nimiž lze souhlasit. Vyzvednul bych ještě poslední odstavec závěru, v němž doktorandka zmiňuje technologický reglement pro výrobu nízkomolekulární a oligomerní kyseliny hyaluronové, který na základě svého vývoje vypracovala. Ten je také v práci vzadu přiložen, škoda, že to závěr nezdurazňuje.

Nyní bych uvedl několik konkrétních připomínek:

- V teoretické části se málo odkazuje na literární zdroje, přičemž jde zjevně o literární poznatky, nikoli vlastní výsledky nebo úvahy autorky (např. str.12).
- Na str. 22 je přehled použitých hyaluronanů. V předchozím textu se zdůrazňuje význam polydispersity, tady ale tato charakteristika chybí.
- Na str. 38, ale i jinde, se mluví o výtěžcích. Bylo by žádoucí jasně a přesně uvést, podle čeho byly výtěžky počítány.
- Rovnici (2) na str. 45 (a podobným dále) asi něco chybí, nebo platí jen v omezeném intervalu času; s přibližováním se nulovému času by podle ní molekulová hmotnost rostla nade všechny meze.
- Buď jsem přehlédl význam (definici) parametru P_n (např. tab. 23 na str. 77), nebo to v práci opravdu chybí.
- Ke str. 93, 94 a přiloženému reglementu. Přesto, že se to dá v práci dohledat, nebo pochopit z kontextu (bod varu) udával bych explicitně teploty (předběžného štěpení v tuhém stavu, při hlavní štěpící reakci atp.).
- Nakonec jednu otázku. Proč byla volena kyselina trifluoroctová? V práci to není nijak vysvětleno, na rozdíl od zcela běžné HCl by si to ale tato kyselina zasloužila.

A pro účely obhajoby bych ještě doplnil všeobecnější otázky, testující schopnost doktorandky se zamyslet na obecné úrovni, až lehce filozofovat:

- Hyaluronany nízkých molekulových hmotností již mateřská firma nějakou dobu nabízí a prodává. Jak se vyrábí a proč tak? Jaký má být rozdíl nebo přínos v případě využití postupů testovaných, vyvinutých v této práci?
- Kde by byla hranice mezi oligomerní (oligosacharidovou), nízkomolekulární (krátkou polysacharidovou) a případně vysokomolekulární kyselinou hyaluronovou?

Doktorandka v uvedené práci prokázala schopnost samostatné tvůrčí práce, zejména v oblasti technologického výzkumu a vývoje. Doporučuji tuto práci přijmout k obhajobě.

Brno, 10. 2. 2013



prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

Oponentský posudek disertační práce

Ing. Zuzany Bezákové

Charakterizácia oligosacharidov a krátkých polysacharidov vzniknutých štiepením kyseliny hyaluronovej metódami kvapalinovej chromatografie a štúdium kinetiky štiepenia kyseliny hyaluronovej.

Ing. Zuzana Bezáková se ve své disertační práci zabývala podmínkami štěpení vysokomolekulární kyseliny hyaluronové s cílem najít optimální podmínky štěpení, které by poskytovaly reprodukovatelné výsledky. Nízkomolekulární kyselina hyaluronová nachází své uplatnění v kosmetice. Podmínky štěpení a vzniklé produkty byly charakterizovány především z hlediska dosažené molekulové hmotnosti a její distribuce a také s ohledem na vznik některých vedlejších produktů.

Cíle práce jsou podrobně stanoveny v úvodu a také byly splněny, jak je i v závěru práce krátce shrnuto. Hlavním cílem bylo najít optimální podmínky pro realizovatelný výrobní postup přípravy nízkomolekulárních frakcí kyseliny hyaluronové štěpením vysokomolekulární suroviny. Tento záměr byl splněn. Návrh výrobního postupu je přílohou disertační práce a autorka konstatuje, že první výrobní šarže byly již dle tohoto reglementu ve firmě Contipro připraveny.

Práce je zpracována velmi pečlivě, jasně a přehledně. Po formální stránce měla být v úvodu doplněna přehledem použitých zkratk. S prezentovanými výsledky a jejich vyhodnocením je možno souhlasit.

K práci mám některé připomínky, které by mohly být předmětem diskuse v průběhu obhajoby:

1) Dle údaje na str. 18 některé specifické enzymy štěpí vazby $\beta(1-4)$. Je v případě kyselá hydrolýzy štěpení jedné ze dvou přítomných typů vazeb preferován? Nebo štěpení probíhá statisticky?

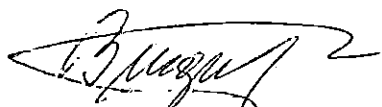
2) Na několika místech (např. str. 83 a 101) autorka uvádí vznik – nárůst karboxylových skupin a přítomnost (vznik?) dvojných vazeb. S touto skutečností se setkáváme i u jiných typů polysacharidů – např. u celulosy při jejím zpracovávání. Bylo vhodné uvést základní schéma vzniku a existence těchto skupin.

3) Mezi kyselinou hyaluronovou určenou pro farmaceutické a kosmetické použití je rozdíl v čistotě? Nebo také v molekulové hmotnosti? (Myšleno před hydrolyzou – štěpením).

4) Škoda, že nebylo více času ani možností pro bližší studium vlivu pH na konformaci polymerního řetězce kyseliny hyaluronové a změnu jejich vlastností, jak autorka připomíná v kap. 2.2.2.3. (str. 17).

Předložená disertační práce představuje velké množství pečlivě provedené, vyhodnocené a zpracované experimentální práce, která nakonec vyústila do přípravy nízkomolekulární kyseliny hyaluronové ve firmě Contipro Group s.r.o., Dolní Dobrouč. Cíle vytýčené v úvodu práce byly splněny. Výsledky práce byly publikovány v prestižních časopisech, nové postupy patentovány a s výsledky práce byla rovněž seznámena odborná veřejnost na dvou konferencích.

Předložená disertační práce splňuje všechny požadavky na ni kladené. ***Práci doporučuji k obhajobě.***



Doc. Ing. Ladislav Burgert, CSc.

Pardubice, 13. února 2013.

Oponentní posudek disertační práce Ing. Zuzany Bezákové na téma „Charakterizace oligosacharidů a krátkých polysacharidů vzniklých štěpením kyseliny hyaluronové metodami kapalinové chromatografie a studium kinetiky štěpení kyseliny hyaluronové“.

Předložená disertační práce se zabývá aktuální a moderní tematikou přípravy a charakterizace biopolymerů prostřednictvím široké škály metod vhodných pro tento typ materiálů. Cílem práce bylo nalezení alternativního způsobu štěpení vysokomolekulárního hyaluronanu sodného na nízkomolekulární analogy až oligosachridy s možností využití v průmyslové praxi. Dalším úkolem byla optimalizace podmínek degradace polymerních řetězců hyaluronanu a stanovení rychlostní konstanty kinetiky štěpení. Porovnání struktury alternativně připravených materiálů s klasicky hydrolyzovanými produkty. Zároveň měly být připraveny technologické podklady pro průmyslovou výrobu nízkomolekulární kyseliny hyaluronové.

Poměrně rozsáhlá práce je na 108 stranách členěna standardním způsobem a celkově vytváří ucelený obraz o dané problematice. Teoretická část přehledně, nicméně velmi stroze na 11 stranách, popisuje nutné informace o přípravě zkoumaných biopolymerů. Výstižně jsou popsány jednotlivé možnosti štěpení výchozí vysokomolekulární kyseliny hyaluronové na níže molekulární frakce. Experimentální část je věnována popisu samotných experimentů, z čehož je patrné, že se autorka dostatečně seznámila s pestrou škálou vhodných metod pro přípravu a charakterizaci tohoto typu biopolymerů. Experimentální metody jsou adekvátní zadaným a zvoleným požadavkům. Kapitola výsledků a diskuse je velmi rozsáhlá a jednoznačně svědčí o intenzivním a pečlivém přístupu. Z koncepce disertační práce je zřejmé, že se patrně jedná o součást výzkumného projektu, který souvisí s výrobou hyaluronových biopolymerů, zkvalitňováním jejich produkce a optimalizací výrobních procesů.

V práci jsou pečlivě uváděny citace a odkazy na práce, které se podobnou tematikou zabývaly v nedávné době a dostatečně kriticky jsou s nimi porovnávány získané výsledky. Pro charakterizaci distribuce molekulových hmotností připravovaných vzorků byla úspěšně užívána moderní analytická technika GPC-MALS, která poskytuje dostatečně průkazné informace nejen o váhovém průměru molekulových hmotností ale i o polydisperzitě zkoumaných makromolekul.

Z výše uvedeného je patrné, že se jedná o práci hodnotnou svým rozsahem i obsahem, zahrnuje velké množství provedených experimentů, jejich následné vyhodnocení a diskusi

získaných dat. Získané výsledky byly publikovány v renomovaných časopisech, což potvrzuje aktuálnost studované problematiky.

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

1. Na straně 9 je na konci prvního odstavce překlep ve slově „výjimočne“.
2. Na straně 13 se zmiňuje, že hyaluronan se užívá jako součást obvazů. Jedná se o chemicky zakotvenou součást, nebo pouze o povrchovou úpravu obvazu?
3. Na straně 14 se hodnotí historická výtěžnost výroby pomocí extrakce, která se pohybovala kolem 1%. U fermentační výroby se píše, že se z 1 litru kultivačního média získají asi 4 gramy HA. Je tato výtěžnost pouze 4X větší? Jaká tedy doopravdy je?
4. Kromě překlepu ve slově syntéza v předposledním odstavci na straně 14 se dále píše, že pro syntézu hyaluronanu je třeba vycházet z těžko dostupných prekurzorů. O jaké prekurzory se jedná?
5. V posledním odstavci na straně 14 se zmiňuje tzv. „standardní molekulová hmotnost“. Co se považuje za standardní molekulovou hmotnost?
6. Na straně 16 se v předposledním odstavci zmiňuje, že výchozí vzorky měly molekulovou hmotnost 2,2-2,8 MDa a po štěpení měly stále 1 MDa. Dá se říci, že touto metodou byla rozrušena pouze jedna nebo dvě vazby v makromolekulárním řetězci?
7. Na straně 17 se ve třetím odstavci zmiňuje „úzká oblast kyselého pH“. Co se myslí touto specifikací „úzká“?
8. Na straně 21 se jako jedna z metod popisuje MALS. Důsledným překladem se jedná o více úhlový rozptyl světla. Není to pouze rozptyl světla.
9. V experimentální části se na straně 23 zmatečně specifikují chemikálie. Někdy jsou specifikovány pomocí chemických vzorců, jindy slovně. Působí to nepřehledně. V případě izopropanolu se chci zeptat, co je zbytkem do 100% zejména u 86-88% suroviny?
10. Na straně 23 se specifikuje použití Ultraturraxu T25. Jaké otáčky byly užívány při homogenizaci?
11. Na straně 26 se v předposledním odstavci zmiňuje „supernatant“. O co se přesně jedná?

12. Na straně 27 je uváděn specifický inkrement indexu lomu pro hyaluronan na hodnotě 0,155 mL/g. Jedná se o literární údaj, nebo o vlastní stanovení. Proč je zároveň zmiňován dextran a pullulan?
13. Na straně 28 by při specifikaci mobilní fáze měly být užívány jednotky mol/l, případně mmol/l místo jednotky „M“. Zároveň se chci zeptat, zda byl gradient tvořen pouze rozdílnou koncentrací těchto dvou mobilních fází? Žádné pufrы nebyly užívány?
14. Hodnoty na obrázku 4 na straně 30 pro pH 5, 4, a 3 končí po 10 minutách. Je k tomu nějaký důvod?
15. Proč nejsou na obrázku 7 na straně 31 hodnoty pro pH 8,5 a 7,5 ?
16. Na straně 32 nemá obrázek 8 ani hodnotu pH 7. Má to nějaký důvod?
17. Na straně 34 je na obrázku 11 při pH v zásadité oblasti při pH 10 menší hodnota. Je to jediný případ pro zásaditou oblast. Je k tomu nějaký důvod?
18. Na straně 35 stejně jako později na dalších stránkách se přisuzuje posun absorpčního spektra v oblasti 210 nm nárůstu karboxylových skupin. Jak mohou tyto skupiny vznikat? Reesterifikací, či změnou amidových skupin?
19. Nic nenamítám proti komerčně zaměřené práci. Přesto bych považoval za nutné, aby studované materiály byly specifikovány pomocí chemicko-technologických parametrů. Z tohoto hlediska považuji specifikaci HA kosmetické kvality a HA farmaceutické kvality za zcela nedostačující. V čem se tyto dva materiály liší? Pouze čistotou, formou přípravy, nebo něčím jiným?
20. Stejně tak je věta na straně 38, která zní „..., protože zákazník požaduje polydisperzitu pod hodnotou 1,4.“ velmi kuriózní. Proč má být tato hodnota nižší než 1,4. Které vlastnosti se v opačném případě výrazně změní?
21. Od obrázku 16 se mnohokrát diskutuje „Výtěžek“ štěpícího procesu. Jak je tento výtěžek definován? Je to váhový poměr získaného a vloženého materiálu?
22. Které body na obrázku 24 na straně 44 přísluší šarži 130604-2 a které šarži 150604-2 ?
23. Jak vznikl matematický aparát (polynom) na straně 45 pro výpočet M_w .
24. Čím se liší šarže na obrázku 28 a na straně 48? Proč má šarže MR 150204/P o třetinu méně naměřených hodnot?
25. Co je důvodem pro rozdílný objem roztoků uváděných na straně 56. Je tím důvodem úprava pH nebo něco jiného?

26. Proč jsou na straně 57 uváděny časy odběru 30, 60, 90 a 240 minut pro 200ml roztoku, dále 23, 47, 90 a 250 minut pro objem 1300 ml, když jsou v grafu pro první případ první uvedeny pouze 3 hodnoty? Odběry uváděné v jednotkách minut byly nutností?
27. Jak se liší šarže ze strany 71 uváděné pro štěpení prostřednictvím autoklávu? Je rozdílné pouze Mw nebo ještě něco jiného?
28. Na straně 72 je užito výrazu, ...že nejnižší frakce se už nevyizolují z roztoku. Slova „vyizolovat ani nevyizolovat“ nemají smysl. Stačí říci neizolovat, či izolovat. Sama podstata slova zahrnuje „vy-“, již v sobě.
29. Obrázky 57-59 popisují experimenty při 105°C ?
30. Jak byl připravován vzorek z obrázku 66? Chybí alespoň stručný popis tohoto biotechnologického procesu. Taktéž je patrný rozdíl v elučních časech tohoto standardního materiálu, který začíná na 20 minutě a u studovaných vzorků na 30 minutě. Jaké to má odůvodnění?
31. Na straně 94 je specifikován výstupní parametr jako počet mikroorganismů. Toto je nutno kontrolovat i při alternativních technikách štěpení?
32. Co představuje hodnota CPM (CFU/g) v tabulce 24?
33. Na straně 101 je ve druhém odstavci řečeno, že rychlostní konstanta byla stanovena při teplotě 128°C. Jak se k této teplotě dospělo?

Závěrem konstatuji, že disertace je dostatečně kvalitní, posouvá kupředu znalosti v dané oblasti a svým rozsahem překonává pouze teoreticky pojatý typ prací. Tímto doporučuji, aby byla bez dalších připomínek přijata k obhajobě.

V Pardubicích 15.2.2013

Ing. Martin Kaška Ph.D

