

## Posudek dizertační práce

**Název dizertační práce:** Využití kyseliny hyaluronové v bioanalýze a biotechnologiích

**Autor:** Mgr. Jitka Kašparová, studentka Univerzity Pardubice

**Oponent:** Ing. Petr Šálek, Ph.D. (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.)

### Slovní hodnocení:

V rámci své dizertační práce měla doktorandka dva dílčí cíle: připravit imobilizovaný enzymatický systém pro kontrolovanou fragmentaci HA a připravit nanočástice vhodné pro použití jako radioprotektivum plic. V teoretické části byly detailně popsány všechny témata, která souvisejí s DP. Cíle DP byly sepsány srozumitelně a realisticky a také splněny. Experimentální část zahrnuje detailní popis všech využitých postupů a metodik. Výsledky a diskuze práce jsou podány srozumitelně a strukturovaně. Velmi oceňuji, že doktoranda vytvořila kapitolu 4.4, kde stručně shrnula velké množství svých výsledků a závěr práce velmi dobře shrnuje celkovou DP. Doktorandka jasně prokázala schopnost vykonání vědecké práce podložené velkým množstvím experimentů, srozumitelnou diskuzí výsledků a na základě svých výsledků i vyvození rozumných závěrů práce. K dizertační práci nemám žádné zásadní připomínky. Jen pár připomínek, kterými upozorňuji na překlepy a zejména na některá nepřesná tvrzení, na objasnění některých podaných informací, dovysvětlení jistých tvrzení či vyhnutí se „přehnaným“ a nepodloženým závěrům.

Prohlášení by mělo být psáno v ženském rodě. Na **str. 33** tvrdíte, že je enkapsulace založena pouze na principu samsoupořádání. Opravdu je tomu tak? Na **str. 35** tvrdíte, že nanoprecipitace není příliš rozšířena? Můžete prosím dovysvětlit? Např. Web of Science při zadání hesel „nanoprecipitation“ a „nanoparticles“ ukázal 1836 výsledků. Na **str. 35** nazýváte kapitolu „Kopolymerní nanočástice“. Dle definice pojmu „kopolymer“ mi v tomto případě nepřijde vhodná kapitola takto nazvat. Nezmínujete se v ni o kopolymerech. Na **str. 37** píšete, že pro přípravu hydrogelů byl použit methakrylát HA. Opravdu? Nešlo o methakrylovanou HA? V dizertaci používáte slovo „koloidální“ (str. 39, 100, ...). Správně je „kolidní“. Na **str. 56** chybně uvádíte, že jste použili HA o různých velikostech a posléze uvádíte molekulové hmotnosti v kDa použitých polymerů. Velikost není mol. hmotnost. **Str. 68** – Na základě čeho, prosím, tvrdíte, že byla veškerá HA rozštěpena na fragmenty o velikosti disacharidových jednotek? **Str. 69**. – Jaký je rozdíl mezi fosfátovým a PBS puforem (bez ohledu na pH)? **Str. 72** – Co přesně myslíte „regenerací nosičů během jejich uskladnění přes noc“? Jak si regeneraci představujete a vysvětlujete? Přijde mi, že se jedná o pracovní vysvětlení určitého jevu. Nicméně nepatří do vědecké práce. **Str. 86** – Proč jste neměřili velikost částic také při úplných fyziologických podmínkách (teplota), když jste plánovali *in vivo* experimenty? S tvrzením na **str. 89**, že: „Postupné zesítnění se uplatňuje při tvorbě 3D strukturovaných polymerů, např. hydrogelů.“, nesouhlasím. Polymer je 3D, i když není zesítnění. **Str. 92** – Jak dle DLS grafu č. 22 vyhodnocujete vliv násobného provázání na velikost částic? Tvorbu vazeb můžete prokázat např. IČ spektroskopii, NMR. Ne však DLS. **Str. 94 a 96** – Které částice jste použili pro experimenty popsané na těchto stranách? Ne úplně zřejmě. **Str. 98** – Doporučil bych používat termín „dispergovat“ a ne „rozpustit částice v ultra čisté vodě“. Nepředpokládám, že jste chtěla částice rozpustit. To by tam pak žádné částice neměla.

**Dizertační práci hodnotím známkou „B“ a doporučuji práci k její obhajobě.**

V Praze, dne 22. března 2020.

Ing. Petr Šálek, Ph.D.

## Oponentský posudek

### disertační práce

Ing. Jitky Kašparové

#### „Využití kyseliny hyaluronové v bioanalýze a biotechnologiích“

Disertační práce Jitky Kašparové zpracovává dvě samostatná témata, jejichž společným jmenovatelem je hyaluronan. Prvým tématem je imobilizace enzymů štěpících hyaluronan, druhým příprava hyaluronanových nanočástic.

Práce má tradiční členění na čtyři hlavní části – teoretickou, stanovení cíle, popis experimentů, výsledkově-diskusní – a závěr. Je doplněna seznamy (symbolů, obrázků ap.), přehledem publikačních výstupů autorky a samozřejmě obsahuje i seznam citované a použité literatury. Po stránce formální úpravy je na standardní úrovni, vzhledem k náplni je text dost popisný, nicméně většinou správně napsaný, jisté výtky budou uvedeny dále.

Teoretická část pojednává o kyselině hyaluronové, její enzymatické degradaci, jejím analytickém stanovení, o její roli v patologických stavech a o nanočásticích na bázi haluronanu. Tato část představuje dostatečnou přípravu pro vlastní činnost, o čemž svědčí i 170 položek v seznamu literatury.

Experimentální část podává přehled použitého vybavení i použitých látek a dostatečně podrobně popisuje použité laboratorní postupy. Zvolené přístupy jsou adekvátní stanoveným cílům, odpovídají soudobým vědecko-výzkumným technikám i možnostem pracoviště, na kterém byla práce vypracovávána, včetně jeho partnerů.

Klíčová je pochopitelně část popisující vlastní autorčiny výsledky. Doktorandka nepochybně odvedla velký kus experimentální práce a v obou dílčích úkolech důkladně propátrala vliv řady parametrů na připravované materiály a jejich vlastnosti. Podařilo se jí úspěšně optimalizovat syntézní postupy a připravit produkty předpokládaných vlastností. Nejvýznamnější vlastnosti, zejména z pohledu dalších aplikací připravených produktů, zevrubně prozkoumala. Postrádám však hlubší interpretaci experimentů a vysvětlení jejich výsledků, srovnání příbuzných systémů. Je škoda, že se doktorandka neponořila hlouběji do diskuse získaných dat a souvisejících zobecnění. Ono už název práce je hodně široký a obecný, o uplatnění hyaluronanu v biotechnologii nakonec snad ani nešlo a bioanalýza byla spíše využita pro hyaluronan než naopak. Závěr práce jen stručně shrnuje výsledky a význam experimentů.

Ze seznamu publikačních výstupů vyplývá, že řada výsledků obsažených v disertaci již byla zveřejněna, přitom nejméně jedenkrát v mezinárodním vědeckém časopise s impakt-faktorem (další dva rukopisy jsou v nějaké fázi redakčního řízení). Zbylé publikační výstupy představují články ve sborníku vědeckých prací domovské univerzity (2 položky), v domácím odborném časopise (1 ks) a konferenční příspěvky (4 položky). Zákonná povinnost toho, aby disertace obsahovala zveřejněné výsledky, tedy byla naplněna.

Nyní musím uvést kritické poznámky formálního i odborného rázu. Po formální stránce uvádím toto:

- Veličina pH je z neznámých důvodů tištěna kurzívou, a pokud je uvedena i číselná hodnota, je to bez rovnítka. Symboly veličin mají být kurzívou, i když to u pH není zatím běžné, rovnítko je potřebné.
- V části 3.3 by bylo pro čtenáře příjemné uvádět, ke kterému konkrétnímu (pod) cíli se daná metodika vztahuje.
- V prvním řádku na str. 57 má být dihydrazid kyseliny adipové, ne hyaluronové.
- Není mi jasné, proč se některé obrázky jmenují obrázky, a jiné grafy. V odborné literatuře jde prostě vždy o obrázek, i když je na něm nějaké grafické znázornění.
- Obrázky 13 a 14 jsou v textu jen zmíněny, bez nějaké diskuse.
- Přinejmenším část 4.1.1 chtělo rozčlenit na více podčástí, orientace při čtení není snadná a shrnující odstavec na str. 77 úplně zapadne.
- Čeština dostává v posledních letech docela na frak, takže pár starosvětských poznámek. Obrázek není vlastní jméno, takže se na něj odkazuje s malým počátečním písmenem. PDI se česky nazývá index polydisperzity, protože právě polydisperzitu charakterizuje; angličtina má slovo tvorbu prostě odlišnou. Pojem solubilní je také podivný, běžně se používá rozpustný, v roztoku, rozpuštěný ap. Ovšem slovo koloidální (např. str. 105) je už úplně hrozné a asi vzniklo doslovně-otrockým převodem z angličtiny. V češtině máme už dlouhá desetiletí ustálený pojem koloidní.

Z odborného hlediska mám tyto připomínky:

- Podivný a nejasný je pojem onkotické síly (str. 16).
- Na obr. 3 jsou základní jednotky glykosaminoglykanů, nikoli samotné glykosaminoglykany, což by mělo být v chemickém textu jasné.
- Výklad anglického bottom-up jako od jádra k povrchu (str. 39) nebude v pořádku, zjevně se jedná o postup dlouho známý v koloidní chemii prostě jako kondenzace, neboli tvorba větších částic z menších (molekul).

- Docela matoucí je pojmenování toho, co se (zřejmě) nenaváže, vazebnou frakcí (např. str. 55. Dobrý by byl také čtenáři viditelný vztah (vzorec), podle kterého se vazebná frakce počítala.
- Stanovení velikosti nanočástic pomocí DLS by bylo bývalo žádoucí doplnit výsledky stejného stanovení pro samotný výchozí hyaluronan (např. str. 88).
- Na str. 89 je tvrzení, že další síťování vedlo k „nechemickému provázání“. Přitom, jestli to dobře chápu, byl prostě znovu nějak použit postup chemického síťování. Toto tvrzení není podloženo experimenty ani podrobnějšími úvahami, ve kterých by se třeba diskutovalo, které funkční skupiny podléhají za daných podmínek chemickému síťování, které ne, kolik by jich zbývalo pro následné síťování ap.
- V diskusi se pracuje pouze s jedinou hodnotou hydrodynamického průměru, byť experimentální data ukazují jeho nezanedbatelnou distribuci. Proto chtělo alespoň uvést, zda diskutované číslo je průměrem, mediánem, popř. jinou celkovou charakteristikou, a dále se zmínit aspoň o polydisperzitě, když už se příslušný index také stanovoval a ukazuje na obrázcích.

Následující otázky mohou být použity při obhajobě disertace:

- Jak přesně byla stanovována koncentrace nanočástic, uváděná např. při studiu skladovatelnosti (část 3.3.6)?
- V literatuře jsou popsány všelijaké nanočástice na bázi hyaluronanu. Co nového si kladla za úkol a co přinesla tato práce (část 4.2)?
- Proč použitý síťovací postup vede ke tvorbě „jen“ nanočástic, proč nedochází k síťování většího objemu, na mikro- nebo makroskopické úrovni?

Závěrem mohu shrnout, že autorka disertace odvedla úctyhodný objem experimentální činnosti, který určitě odpovídá předpokladům doktorského studia. Doktorandka shromáždila bohatý experimentální materiál a prokázala schopnost tvůrčí práce; vytčené cíle lze považovat za naplněné. Posuzovaná disertační práce jako celek splňuje zákonné požadavky i obecné požadavky na tento typ práce kladené. Doporučuji práci přijmout jako odpovídající podklad pro obhajobu.

Brno, 20. 3. 2020

prof. Ing. Miroslav Pekař, CSc.

---

**Posudek disertační práce****Mgr. Jitka Kašparová****Využití kyseliny hyaluronové v bioanalýze a biotechnologiích**

Disertační práce se zabývá využitím kyseliny hyaluronové v bioanalýze a biotechnologiích. Práce je logicky rozčleněna. Teoretická část pojednává o kyselině hyaluronové, její struktuře a vlastnostech, možné enzymatické degradaci pomocí bakteriálních hyaluronidáz a rovněž analytických postupech využívaných k její charakterizaci. Velká část je pak věnována přípravě nanomateriálů právě na bázi kyseliny hyaluronové. Popsány jsou rovněž základní techniky pro charakterizaci nanomateriálů.

Experimentální práce je poté rozdělena do dvou samostatných částí. První se zabývá přípravou magnetických nosičů s imobilizovanými bakteriálními hyaluronidázami a jejich využití pro enzymatické štěpení kyseliny hyaluronové. Ve druhé části se pak autorka zabývá přípravou nanočástic na bázi kyseliny hyaluronové. Jejich zamýšlené využití jako potenciálních nosičů pro cílenou distribuci léčiv či jako radioprotektiva už v práci uvedené není.

Práce vychází ze 4 publikovaných článků, avšak pouze jednoho v časopise s impaktním faktorem (Prosess Biochemistry, IF 2,883). Jedna publikace je odeslána k recenznímu řízení a další je v přípravě. Nicméně přílohy k disertační práci nejsou. Mgr. Jitka Kašparová je u většiny prací uvedena jako první autorka.

Po formální stránce je práce zpracována na dobré úrovni, některé obrázky v teoretické části se jeví nadbytečné (např. Obrázek 5) nebo obsahují chyby (např. vzorec kyseliny hyaluronové na Obrázku 1, popřípadě chybějící označení polymeru na Obrázku 3). Po stránce obsahové nelze práci mnoho vytknout, neboť stěžejní část díla zaměřená na přípravu magnetických nosičů s imobilizovanými enzymy prošla oponentským řízením.

Autorka splnila vytčené cíle a k vlastní práci bych měla pouze několik dotazů a připomínek:

Na straně 54 uvádíte, že při imobilizaci enzymů na magnetickou perlovou celulózu byl kyanoborohydrid sodný použit ke stabilizaci vzniklé vazby pouze v případě SpnHL. Z jakého důvodu se stejný postup nepoužil při imobilizaci SpyHL?

Ve vzorku SpnHL byly pomocí SDS-PAGE (str. 64, Obrázek 12) analýzy identifikovány pouze 2 proteiny, vlastní enzym SpnHL a TIM. Komentovaný je rovněž další protein o molekulové hmotnosti 34 kDa, který nebylo možno identifikovat. Nicméně na záznamu je patrný další proužek o molekulové hmotnosti o něco nižší než SpnHL. Byl i tento protein podroben identifikaci a o jaký protein se tedy jedná?

Na straně 68 uvádíte, že štěpení v případě MPC-IDA-SpnHL probíhá pomaleji než v případě MPC-SpnHL (Graf 2). Jakou to má příčinu, když množství imobilizovaného enzymu je větší u orientované imobilizace?

Čím si vysvětlujete pokles aktivity imobilizovaných enzymů ve fosfátovém pufru jako vazebného nebo reakčního prostředí (str. 70)? V případě MPC-SpnHL je patrný nelogický trend v aktivitě imobilizovaného enzymu v různém prostředí (0,1 M fosfátový pufr pH 7,0 vs. 0,01 M fosfátový pufr pH 7,0 vs. ultračistá voda). U grafů 3 a 4 uvádíte směrodatnou odchylku z  $n=3$ . Jedná se o tři štěpení použitím stejného nosiče s imobilizovaným enzymem nebo o tři různé imobilizace?

Na straně 71 zdůvodňujete nižší aktivitu MPC-SpnHL v porovnání s MPC-IDA-SpnHL přítomností dalších proteinů ve vzorku enzymu a tudíž i jejich následnou kompeticí při imobilizaci. Nicméně z SDS-PAGE analýzy na straně 64 (Obrázek 12) je patrná výrazně vyšší koncentrace enzymu v porovnání s kontaminujícími proteiny, ale rozdíl v aktivitě enzymových reaktorů připravených orientovanou a neorientovanou imobilizací je trojnásobný. Co dalšího může způsobovat tento výrazný rozdíl?

Jakým způsobem byla potlačena nescifická sorpce enzymů na použité nosiče? Nemůže být právě nescifická sorpce a následné uvolnění enzymu důvodem k výraznému poklesu aktivity nosičů v případě neorientované imobilizace (nízká skladovací stabilita MPC-SpnHL, str. 73)?

Můžete porovnat použité magnetické nosiče (např. množství vazebných míst) a tedy i vliv použitých imobilizačních technik na výslednou účinnost připravených enzymových reaktorů?

Jaká je molekulová hmotnost SpyHL? V teoretické části uvádíte, že bakteriální hyaluronan lyázy mají molekulovou hmotnost 90-120 kDa. Na gelu z SDS-PAGE analýzy je patrný výrazný proužek o 37 kDa. Jedná se tedy o enzym produkovaný bakteriofágem nebo bakterií *Streptococcus pyogenes*?

Čím si vysvětlujete výraznou ztrátu aktivity MPC-SpyHL v porovnání s MPC-SpnHL nebo MPC-IDA-SpyHL (operační a skladovací stabilita)?

Na straně 88 uvádíte, že v případě použití EDAC\* je možné použít pufrы s obsahem karboxylových kyselin nebo aminů na rozdíl od reakcí s EDAC. Nicméně v obou případech dochází ke kompetitivním reakcím při imobilizaci enzymů. Můžete to vysvětlit?

Proč byla zvolena teplota 60 °C pro vysoušení nanočástic (str. 98), když při této teplotě již dochází k jejich degradaci jak je uvedeno v kapitole 4.3.1.1?

Nanočástice kyseliny hyaluronové byly připravovány za účelem potencinálního použití jako nosičů pro cílenou distribuci léčiv či jako radioprotektiva. Uvádíte, že tato část práce byla prováděna ve spolupráci s Katedrou radiobiologie Univerzity obrany v Hradci Králové. Uskutečnily se již testy na myších modelech a můžete nás tedy ve stručnosti seznámit s jejich výsledky?

Uvedené připomínky/dotazy nikterak nesnižují kvalitu předložené práce a vzhledem k výše uvedenému **doporučuji přijetí disertační práce k obhajobě.**

V Brně 20. dubna 2020

Mgr. Jana Křenková, Ph.D.  
Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.