

## “Analýza oligomerů kyseliny hyaluronové“

Diplomová práce Bc. Miroslava Kubáta byla vypracována na Katedře biologických a biochemických věd ve spolupráci s firmou Contipro a.s. Experimentální práce byla zaměřena na optimalizaci extrakce oligomerů hyaluronové kyseliny (oHA) methanolem z biologické matrice a jejich kvantitativní analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie v MRM módu.

V teoretické části diplomant popisuje strukturu, vlastnosti a použití HA ve farmacii a medicíně. Kyselina hyaluronová je lineárním polysacharidem složeným z disacharidových podjednotek N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukuronové kyseliny spojovaných  $\beta$ -1,4-glykosidickými vazbami. Jedinečnou vlastností HA je schopnost adovat vodu v až tisícinásobku vlastní hmotnosti a vytvářet gelovité biokompatibilní struktury schopné vyplňovat kloubní prostory a tlumit mechanické nárazy. Oligomery HA vznikají při zánětlivých, onkologických, metabolických, mechanických a dalších poruchách a poškozeních organismu a jsou markery těchto pochodů. Celá teoretická část je zpracována encyklopedickým způsobem s literárním odkazem téměř na každý odstavec textu. Tímto způsobem diplomant sice shromáždil maximum informací o kyselině hyaluronové, ale např. konkrétní přípravu oligomerů (oHA) a nenasycených derivátů ( $\Delta$ HA8 a  $\Delta$ HA16), se kterými diplomant pracoval, jsem v teoretické části nenalezl. Mohl by to diplomant doplnit v prezentaci? Rovněž popis kolorimetrických, imunoanalytických a elektroforetických analytických metod je dle mého názoru nadbytečný, protože s nimi diplomant vůbec nepracoval. Informace pro teoretickou část diplomant získal z 218 téměř výhradně zahraničních publikací. Zde mám dotaz, zda diplomant přečetl všechny uvedené publikace a jak originální publikace získal, protože i pro mě byla většina publikací nedostupných z důvodu poplatků za přečtení celé publikace.

Experimentální část dokazuje, že diplomant provedl dostatečný počet měření pro podrobnou analytickou charakterizaci extrakce oligomerů HA ze čtyř částí gastrointestinálního traktu (GIT) myši a prostudoval vlivy koncentrace matrice, pH a octanu amonného na její výtěžnost. Metodika UPLC-MS stanovení byla podrobně analyzována standardními analytickými postupy, byla určena linearita, správnost a přesnost. Konkrétní analýzy  $^{13}\text{C}$ - $\Delta$ HA2 z GIT a výpočet obsahu dalších  $\Delta$ HA byly rovněž provedeny zcela správně a nemám k nim žádné připomínky.

V diskusi diplomant popisuje problematiku vývoje analytické metodiky, konkrétně problémy se zanášením chromatografické kolony a s kalibrací hmotnostního detektoru. Dále diplomant řešil problémy s posunem retenčních časů v průběhu následných analýz. Na Obr. 12 – 16 dokumentuje řešení popisovaných experimentálních problémů.

Závěrem diplomant konstatuje, že byla vyvinuta spolehlivá, citlivá a selektivní analytická metoda pro stanovení koncentrace oHA v biologických vzorcích. Zde mám dvě otázky. 1). Nalezne tento nový analytický postup uplatnění ve výzkumu, nebo v rutinní analýze s ohledem na cenu UPLC-MS sestavy? 2). Jaká je cena za jedno stanovení, jakou má analýza vypovídající hodnotu pro případné budoucí pacienty a jaké jsou cenové relace jiných postupů s obdobným analytickým výsledkem?

Závěrem konstatuji, že diplomant splnil zadání diplomního úkolu v požadovaném rozsahu a předložil závěrečnou zprávu s výborným experimentálním výstupem.

**Diplomovou práci Bc. Miroslava Kubáta doporučuji k obhajobě a hodnotím ji známkou**

**B**

V Pardubicích 17. května 2021

prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
oponent