

Oponentský posudek disertační práce Ing. Jana Lukáška „Synthesis of pyrrole-cyclodextrin conjugates for tissue engineering“

Předložená disertační práce se zabývá designem, syntézou, fyzikální charakterizací a studiem kompatibility titulních konjugátů s ohledem na možné využití v oblasti biologických materiálů.

Disertační práce trochu netypicky začíná cílem práce, který by spíše měl následovat po literární rešerši a na jejím základě by pak cíle byly formulovány. Teoretická část zahrnuje všechny oblasti dotčených oborů, tj. jak návrhu a syntézy výchozích pyrrolových monomerů, přípravu konjugátů, jejich polymeraci, charakterizaci polymerů, roubování cyklodextrinů na polymer, studium biokompatibility připravených konjugátů a jejich následného testování v buněčných strukturách.

Konstatuji, že ve všech zmíněných oblastech se doktorand dokázal orientovat a zhostil se úspěšně všech úkolů. Syntetická organická chemie v oblasti sloučenin pyrrolu obvykle nebývá snadná, autor zde vypracoval efektivní syntézy beta-substituovaných pyrrolů. V těchto intermediátech využil různé funkční skupiny a především pak skupinu karboxylovou a trojnou vazbu pro vznik konjugátů připojených vazbou amidovou, popř. triazolovým heterocyklickým systémem s využitím click-chemie. Následně studoval vhodný způsob polymerace monomerních pyrrolů a jejich depozici na PCL a vzniklé polymery charakterizoval metodami SEM, IR, NMR a XPS. Konjugáty s cyklodextriny pak byly analyzovány fluorescenční spektroskopii pro získání informací o počtu navázaných CD jednotek. Následně se podařilo potvrdit jejich biokompatibilitu s vybranými biologickými materiály, kde byl také prokázán kladný vliv na růst buněk. V dalším rozšíření práce pak byl studován vliv délky alifatické spojky a využití dalších vláknitých polymerů jako nosičů.

Dále uvádím neúplný výčet řady formálních chyb, na které jsem narazil při čtení textu, často spojených s nedostatky v angličtině.

Nejprve používání zkratk: Přestože je v závěru práce uveden seznam zkratk, uvítal bych standardní praxi, kdy se při jejich prvním uvedení v textu vypíše její název a následně se zkratky používají.

Str. 27, schéma 5. špatný název dibromo alkyl, má být dibromoalkane, totéž diiodoalkane, str. 28 etheric, má být ethereal, str. 31 cyanate, má být cyanide, butanolate, má být butoxide.

Str. 34, TsO₂ není anhydrid. Ve schématech 13 a 14 týkající se syntéz tosylátů: související text nekoresponduje se schématem, tj. byl použit TsCl nebo Ts₂O?

Usměvná připomínka, str. 70,71: může mít v názvu sloučenin **16,17** aldehyd jiný lokant než 1?

K práci mám dále několik dotazů:

1. Str. 27: Při bromaci TIPS-pyrrolu byl detegován i 2-bromderivát. V následujících transformacích se o vedlejších produktech nehovoří, kam se ztratily?
2. Nebylo by možné v syntéze látek **8,9** využít transmetalace pyrrolyllithií na organozinečnaté deriváty s nižší bazicitou? Při použití dihalogenalkanů lze očekávat produkty dvojnásobné reakce, nebyly izolovány?
3. Str. 36: Při click-reakci mezi alkynem a azidem se někdy řeší problém regioselektivity cyklizační reakce. Nebyl detegován i 1,5-disubstituovaný triazol?
4. Jak si vysvětlujete rozdílnou reaktivitu beta-substituovaných pyrrolů **28,30** při polymeraci v porovnání s pyrrolem?
5. Jaké jsou příčiny vzniku defektů v polymerech v přítomnosti vody? Dochází k následným reakcím polymeru? Je znám stupeň pokrytí PCL a jaká je tloušťka vrstvy polymeru na PCL?
6. Str. 49: Dle výsledků fluorescenční analýzy dochází k připojení CD na **54** jen v malém rozsahu. Jaké jsou důvody?

Disertační práce Ing. Lukáška je produktem výzkumu spojujícího různé obory základního a materiálového výzkumu. Základem práce je design a syntéza sérií organických látek, které se využijí pro přípravu funkčních materiálů. Ty se pak musí charakterizovat použitím sofistikovaných fyzikálních, analytických i biologických metod pro získání požadovaných výsledků a hodnocení jejich využitelných vlastností. Ve všech těchto oblastech se doktorand dokázal orientovat a využít vhodných metod pro důkladný popis získaných materiálů. Přestože jsem v textu poukázal na některé nedostatky, ty nijak nesnižují její vysokou kvalitu. Práci tudíž doporučuji k obhajobě.

Praha, 20.7. 2019

Prof. Ing. Jiří Svoboda, CSc.



**Referee's comment of doctoral thesis submitted by
Ing. Jan Lukášek**

Synthesis of pyrrole-cyclodextrin conjugates for tissue engineering

The thesis aim was preparation of polymeric composite materials for tissue engineering and understanding the effect of surface functionalization on the cell-material interaction. This aim was achieved using substituted pyrrole derivatives suitable for the cyclodextrin attachment as outer layer of electrospun polymeric fibres utilized as a carrier. In the first part β -substituted pyrroles have been synthesized with iodo, cyano, azido, carbonyl, a carboxyl group or with multiple terminal bond and spectroscopically characterised. Followed synthesis of pyrrole-cyclodextrin monomers after copolymerization with pyrrole created desirable layer with cyclodextrin decorated surface. Cyclodextrin was chosen because its lipophilic cavity, which attracts adhesion-mediating proteins by non-bonding interaction and thus creates extracellular matrix mimicking structures on the surface. This interaction is crucial for the absorption of proteins in their natural spatial conformation which can lead to significantly better cell adhesion and growth. Work also contributed to traditional research at Technical University in Liberec using electrospun polymeric scaffolds for medical application.

Novelty of the work is clearly demonstrated, creating desirable core-shell material with cyclodextrin decorated surface. Also alternative route was suggested based on the preparation of a fibrous matrix with deposited β -substituted polypyrrole (PPy) layer followed by cyclodextrin immobilisation. It needs multidisciplinary approach and cooperation of specialist.

Presented PhD thesis has a standard content, started with short introduction about conducting polymers and historical milestones, dopants and their influence on final polymer conductivity is described. The evaluation of interactions between cells and new created material is provided to understand mechanical and chemical properties of the newly designed scaffold.

Experimental part is described adequately. I appreciate providing structures to all synthesized compounds marked with numbers. Thesis contains comprehensive list of references, which counts 150 papers.

Aims of the work are explicitly formulated. Conclusions are composed with main findings of thesis.

Formally, the PhD thesis has a good level, including illustrations, and graphs. The English text is well understood but some stylistic or grammatical errors are present. However from the terminological point of view, it is necessary to draw attention to several inaccuracies and stylistic shortcomings, here are some examples:

- for thermogravimetric analysis results using TGA spectrum is wrong, it is TGA curve
- precious explanation of all Figures is only in text, but it is recommended to use more precious description in Figure caption (Fig. 8 and others).

- it will be beneficial for the reader to use also full name of product when first time mentioned in text, not only abbreviation, e.g. polymeric matrices in section 3.6.2, PDX, P4HB, etc.,
- explanation of MTT abbreviation is missing

I have also some comments and questions to PhD thesis.

1. In the Experimental part the preparation of polycaprolactone (PCL) fibres is missing. Add details including solution properties and final thickness of prepared fibres. For all experiments of polypyrrole coating the same PCL fibres prepared needlessly electrospinning was used (except the first part where PCL prepared by drawing technique was used)?
2. Quite complicated techniques, TGA was used for estimation of thickness of substituted PPy on PCL fibres. Usually SEM images of fibres before and after coating are evaluated using various software, e.g. ImageJ software. Why this tool was not used?
3. In the part X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) results are presented only for selected elements (Fig. 17), carbon, oxygen and nitrogen. Provide Table with whole composition of studied materials, PCL and PPy53. From this results it will be possible to know doping level of substituted PPy.
4. PCL-PPy-CD composites can find several applications in tissue engineering for their superior mechanical properties and good environmental stability. Details about mechanical stability of PPy-CD layer on PCL fibres are not mentioned in the thesis. How mechanically stable is outer layer? It is crumble, or really good adhered?
5. In the part Target of the work it was mentioned, that core-shell 3D matrix with a deposited conductive polypyrrole layer on the surface could be used for cell guidance by external electric stimulation. Did you measure conductivity of some product coated of PCL fibres?

Conclusions

Finally, I would like to summarize that the author of this thesis demonstrated the ability of independent and creative scientific work. The work contains a large number of interesting original results which are presented and discussed. Personal contribution of the author is visible also from published papers. Jan Lukášek published 5 papers in scientific journals with high IF, one paper is in press. There are already citations registered in WOS database on published papers.

After the answering questions and successful defence of the thesis, I recommend to award Ing. Jan Lukášek the degree

“Philosophiae doctor”.

Bratislava, July 29, 2019

Mária Omastová, PhD., D.Sc.
E-mail: maria.omastova@savba.sk