



Prof. RNDr. Věra Pacáková, CSc.  
Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra analytické chemie  
ALBERTOV 2030, 128 40 Praha 2, ČR  
tel. + fax +420224913538, pacakova@natur.cuni.cz  
V Praze dne 1.2.20109

Oponentský posudek disertační práce Mgr. Martina Brauna „Vývoj a využití vysokoúčinných separačních metod pro analýzu pojivových tkání“

Disertační práce Mgr. Martina Brauna je zaměřena na důležitou oblast výzkumu, na klinické sledování degradace pojiva a vývoj vhodných analytických metod pro stanovení fragmentů kolagenu a elastinu.

Autor byl postaven před úkol vypracovat spolehlivé metody pyridolinu, desoxypyridolinu, pentosidinu, desmosinu a isodesmosinu, které jsou použitelné i pro velmi malá množství vzorku. Autor se zaměřil na kapalinovou chromatografii ve spojení s UV a fluorescenčním detektorem. Oba detektory jsou dostatečně citlivé, avšak při klinických aplikacích bylo nutné použít přečištění a prekoncentraci. Použitá extrakce tuhou fází byla optimalizována. Testována byla rovněž možnost využít pro tyto účely kapilární elektroforézu.

Autor použité metody optimalizoval, HPLC metodu částečně validoval a aplikoval ji v řadě klinických studií.

Lze konstatovat, že cíle disertace byly splněny. Autor vykonal velký kus experimentální práce a získal původní publikovatelné výsledky přímo aplikovatelné v klinické praxi.

Práce je velmi obsáhlá. Je založená na 9 publikacích v českých a mezinárodních časopisech, z toho 8 impaktovaných. Obsahuje rozsáhlý teoretický úvod, který se týká převážně biochemických a klinických aspektů dané problematiky. Obsahuje všeobecně známé informace o separačních metodách a SPE, které do disertace nepatří. V práci naopak postrádám důkladnou rešerši analytických prací týkajících se studovaných analytů (je uveden pouze jeden odstavec na str. 33 a dvě strany (str. 40 – 43) spíše obecného povídání než konkrétních údajů.

K práci mám několik dalších připomínek a dotazů:

- 1) Validaci analytické metody považuji za nedostatečnou. Vždy mají být uváděna experimentální data, která byla v rámci validace změřena, která v disertaci chybí. Zde je uvedena pouze opakovatelnost ploch, LOD, LOQ, linearita a výtěžnost. V práci není nikde uvedeno, jaké koncentrace se hodnoty opakovatelnosti a výtěžnosti týkají. Výtěžnost by měla být provedena minimálně pro tři koncentrace, počínaje LOQ do 150 % nominální hodnoty. Chybí hodnoty reprodukovatelnosti. Robustnost HPL metody zahrnuje zjištění vlivu změny složení a průtoku mobilní fáze, teploty měření a typu kolony na přesnost měření. Toto parametry nejsou v práci uvedeny.
- 2) V práci se uvádí, že autor stanovuje příčné vazby, separuje příčné vazby – nestanovuje vazby, ale produkty štěpení.
- 3) Str. 41 – jaká je cena HPLC analýzy ve srovnání s ELISA?
- 4) Str. 43 – „CE má slibnou budoucnost na poli proteomiky“ to je už přítomnost.

- 5) Str. 50 – mechanismus iontově párové chromatografie není správný.
- 6) Kdo připravil standard pentosidinu?
- 7) UV spektra str. 70 – jaká koncentrace byla použita?
- 8) Obr. 28 – Proč je optimální gradient f) a proč ne třeba c)? Doba analýzy je ještě kratší, pík je symetrický.
- 9) Obr. 25 na str. 76 – osy nmol/L, v textu nmol/ml. Co je správně?
- 10) Str. 127, publikace 6, název časopisu Alcohol Alcohol?
- 11) Kvantitativní stanovení – stanovení je vždy kvantitativní.
- 3) Matrix – správně česky matrice.

Závěr:

Výsledky disertace představují významný příspěvek k problematice klinického sledování fragmentů kolagenu a elastinu. Výsledky jsou přímo využitelné v klinické praxi.

Doporučuji, aby disertační práce Mgr. Martina Brauna byla přijata k obhajobě a aby se stala základem pro udělení vědecké honosti Ph.D.