

Oponentský posudek: Vývoj a validace nových HPLC metod pro stanovení biologicky aktivních látek v klinické praxi

Univerzita Karlova  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Děkanát  
Akademika Heyrovského 1203/8  
500 03 Hradec Králové

## OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

**Vývoj a validace nových HPLC metod pro stanovení biologicky aktivních látek v klinické praxi**

Kandidát: Mgr. Lenka Krčmová

Školitel práce: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Dagmar Solichová, Ph.D.

Katedra : Analytické chemie

*Práce vznikla za podpory Specifického vysokoškolského výzkumu SV-2010-261-00.*

Zpracoval: Doc. RNDr. František Malíř, Ph.D.

Univerzita Hradec Králové  
Pedagogická fakulta  
Katedra biologie  
náměstí Svobody 301/1  
500 02 Hradec Králové  
&  
Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra biologických a biochemických věd  
Studentská 573  
532 10 Pardubice

## Úvod:

Předložená disertační práce má v souhrnu 357 stran (včetně tabulek, obrázků, vzorců, literatury a příloh „Analytické publikace“, „Klinické publikace“ a „Vybraná plakátová sdělení“). Grafické zpracování, úprava i jazyková úroveň jsou vynikající.

Práce předložená k obhajobě je rozdělena na **2 hlavní - části**.

Po „Úvodu“ (2 str.), je vysvětlen „Cíl práce“ (2 str.) a následuje „Seznam použitých zkratk“ (3 str.).

Pak následuje **teoretická část** (108 str), která se zabývá rozvojem HPLC, moderními technologiemi v HPLC, moderní instrumentací v HPLC, validací HPLC metod v bioanalýze, dále preanalytickou částí, zpracováním biologického materiálu před HPLC analýzou a dále jednotlivými analyty - retinoly, vitamin E, neopterin, kynurenin a tryptofan, kreatinin (vždy z hlediska historie, fyzikálně chemických vlastností, metabolismu a klinického významu, koncentrací v biologických tekutinách. V teoretické části, která je značně rozsáhlá, je uvedeno celkem 72 obrázků a 24 tabulek.

Vlastní **experimentální část** (40 str) autorka rozdělila na 2 části. V první z nich se zabývá miniaturizací metody pro stanovení vitaminů A a E, stanovením kyseliny retinové v séru, dále pak neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v séru a konečně testováním deep-UV-LED jako vhodného zdroje pro fotometrickou detekci v kapilární elektroforéze. Druhá část je klinická a uvádí komentář k jednotlivým biomedicínským studiím. V této části je uvedeno dalších 33 obrázků a 18 tabulek. Závěr práce přehledně shrnuje nové trendy ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii v kombinaci s moderním zpracováním biologického materiálu. Při zpracování biologického materiálu je kladen důraz především na preanalytickou fázi, která je klíčová a souvisí s ní největší možná analytická chyba. Vyvinuté metody přispěly k rozšíření metodik ve Výzkumné laboratoři GMK a měly by přispět při řešení cílů jak jednotlivých klinických studií, tak k objasnění některých aspektů chemoterapeutické léčby některých závažných onemocnění.

Disertační práce je zpracována velmi pečlivě, čtivě, je přehledně členěna a má logickou návaznost. Literární citace jsou psány ve zkrácené formě, což se připouští. Uvítal bych samozřejmě úplné citace, ale práce by byla ještě mnohem rozsáhlejší. Citací je celkem 217, včetně nejnovějších literárních údajů z roku 2010 (více než 25 %). Na základě disertační práce byly publikovány 4 významné analytické publikace /všechny s IF v rozsahu od 1,703 do 3,272 (ANALYST), kde je kandidátka 3 x první autor a 1 x druhý autor/. Tyto metodiky byly konkrétně využity v rámci v práci doložených 14 klinických publikací (pozn.: všechny s IF od 0, 379 do 1,792), v nichž je kandidátka vždy spoluautorkou. Na základě této práce bylo prezentováno 30 posterů na národní i mezinárodní úrovni, z toho 1 poster v zahraničí oceněn druhým místem, 8 přednášek na národní a mezinárodní úrovni, z toho 1 přednáška v zahraničí byla oceněna prvním místem v kategorii do 35 let. V rámci této práce kandidátka řešila jako spoluředitel, hlavní řešitel nebo spolupracovník také 6 grantů a konečně byla na 2 stážích v rámci programu ERASMUS na Univerzitě v Dublinu.

**Aktuálnost zvolené problematiky:**

1. Problematika analýz biologického materiálu metodami vysokoúčinné kapalinové chromatografie a její modifikace jsou v poslední době v popředí stále většího zájmu nejenom výzkumníků, ale i pracovníků rutinních laboratoří ve zdravotnických zařízeních. Situaci navíc umocňuje i stále větší nárůst civilizačních chorob. Práce umožnila nejenom rozšíření spektra o nové vyšetřovací metody, ale především přispěla k zavedení moderních postupů, umožňujících přípravu velkých sekvencí vzorků biologického materiálu, dále umožnila, vedle urychlení separací jednotlivých analytů, minimalizaci objemů rozpouštědel a vlastních vzorků (snížení jejich spotřeby). Vedle ekonomického přínosu má obrovský význam využití těchto metod především pro klinický výzkum a praxi, nejenom pro potřeby pracovníků Výzkumné laboratoře GMK a lékařů – specialistů na Klinice gerontologické a metabolické (GMK) Fakultní nemocnice v Hradci Králové, ale i pro specialisty onkology z Onkologické kliniky Fakultních nemocnic v Hradci Králové a Olomouci- s cílem monitorovat pacienty uvedených klinik.

**Cíl disertační práce:**

Nemohu konstatovat nic jiného než, že cíl předložené disertační práce „vývoj a validace nových HPLC metod a revalidace stávajících HPLC metod, aplikovatelných pro klinický výzkum a praxi ve Fakultních nemocnicích v Hradci Králové a Olomouci“ byl naprosto bezzbytku splněn.

**Zvolené metody práce:**

Zvolené metody práce odpovídají stavu poznání v dané době, dále technickému vybavení a možnostem pracoviště. Kandidátka dále správně vybrala reagenty, chemikálie a spotřební materiál k dané práci, výborně se v této práci orientovala a navíc k tomu využila i nejnovější podklady získané na základě řešení diplomových magisterských prací a projektů v rámci ERASMU a konečně i na základě zkušeností získaných z vlastních zahraničních pobytů v Irsku.

**Výsledky práce:**

Spočívají hlavně v miniaturizaci metody pro stanovení vitaminů A a E v lidském séru, kdy v navíc kombinaci monolitických stacionárních fází s moderním SPE sorbentem došlo ke zjednodušení preanalytické i analytické fáze. Dále ve stanovení kyseliny retinové, retinolu a alfa a gama-tokoferolu v séru, kdy použití monolitické stacionární fáze umožňuje separaci 5 látek během 7 min a použití octanu amonného zlepšilo symetrii píku látek s karboxylovou skupinou (kys.retinová) Byla vyvinuta metoda HPLC pro stanovení neopterinu, kynureninu, kreatininu a kyseliny močové v moči s jednoduchou přípravou vzorku pro měření velkých sérií, dále pak metoda stanovení neopterinu, kreatininu, kynureninu a tryptofanu v lidském séru, která byla plně validována a jejíž předností její rychlost a vhodnost pro zpracování velkých sérií vzorků. Konečně se kandidátka v rámci zahraniční stáže zabývala testováním deep-UV-LED jako vhodného zdroje pro fotometrickou detekci v kapilární elektroforéze, kdy byla pro separaci vybrána směs nukleotidů.

**Přednosti disertační práce:**

Práce je především úplným přehledem řešené problematiky s detailními popisy, velmi hodnotnými výsledky, shrnutými v tabulkách a přehledných grafech, doloženými řadou vynikajících publikací, které mají všechny IF.

**Nedostatky disertační práce:*****Pouze formálního rázu:***

Vzhledem k rozsahu disertační práce se kandidátka neubránila některým drobnějším tiskovým chybám, což je patrné teprve při, opravdu velmi pečlivém, přečtení textu (*což přisuzuji spíše automatickým opravám počítače*), které jsou však naprosto ojedinělé, např. na str. 158 (poslední odstavec 2.věta shora - výrobci LED tento parametr neuvádí, správně má být neuvádějí), na str. 184 (1.věta – nové trendy ve.... nabízí, správně má být nabízejí), na str. 185 (4. věta shora – správně - krátká doba, ne krátá, dále 11.věta shora- byla brána zřetel, správně má být – byl brán zřetel), str. 191 (u citací č. 65 a č. 66, kde by mělo být správně International conference, ne Internation conference a chybí i datum vydání) a dále např. na str. 200 (správný název je International Journal of Environmental Analytical Chemistry- ne Chemismy). Hodnotu díla nesnižuje ani teoretická část, která je velmi rozsáhlá a značně převyšuje teoretickou část v ČR běžně podávaných a obhajovaných disertačních prací. Musím však poukázat na to, že např. ve Francii je takový rozsah disertačních prací běžný. Teoretická část je napsána přehledně a jasně a zcela jistě by mohla sloužit také jako skriptum.

A konečně v závěru bych navíc uvítal alespoň stručné shrnutí výhod uvedených nově zavedených, případně revalidovaných metod ( i když je to v textu vysvětleno).

**Dotaz na kandidátku:**

1. Jaké je srovnání těchto nově zavedených HPLC metod stanovení, zde zmíněných analytů, s jinými analytickými metodami, např. imunochemickými, jejich přednosti a nedostatky ?!

**Závěry:**

Kandidátka zpracovala přehlednou disertační práci na velmi vysoké úrovni, která jasně dokumentuje získané výsledky experimentální práce a prokázala v ní velmi dobrou schopnost samostatného tvůrčího řešení. Po odborné stránce dosáhla všech hlavních cílů a splnila tak zadání stanovené na školícím pracovišti. Práce je dobře využitelná, jak v další vědecké i učitelské práci, protože představuje velmi důležitý studijní a informační materiál. Vypracované analytické metody jsou nesmírně cenné, protože slouží jak ke zrychlení biologických analýz, tak k minimalizaci použitého objemu vzorku biologického materiálu (kdy je snaha z etického hlediska preferovat neinvazivní odběry, případně provádět odběry, co nejméně zatěžující organismus vážně nemocného pacienta) a v neposlední řadě umožňují minimalizovat objem použitých chemikálií, potřebných pro analýzy, což snižuje náklady a představuje významnou ekonomickou úsporu. Co ale vyzdvihují nejvíce a čeho si velmi cením, že jsou především využitelné v klinické praxi k monitorování pacientů se závažnými onemocněními. Dle mého názoru je předložená práce svojí kvalitou na úrovni habilitačního spisu a nezbyvá nic jiného, než vyzdvihnout a ocenit výkon kandidátky.

**Podle § 47, odst.4, zákona č. 11/1998 Sb., o vysokých školách proto navrhuji příslušné komisi přijmout její práci jako podklad k udělení titulu PhD.**

V Hradci Králové, dne 6.září 2010

Podpis: F.Malíř

