

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI

Název: Využití separačních metod v klinickém výzkumu

Autor: Mgr. Markéta Drastíková

Oponent: Doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.

Předložená disertační práce má celkem 180 stran, včetně přehledu publikační činnosti, řešených grantů a příloh ve formě odborných článků. V úvodu autorka diskutuje význam separačních analytických metod jako moderního nástroje umožňujícího řadu důležitých biochemických a klinických vyšetření. Následují cíle práce, které přímo souvisí především s požadavky na analýzy ve Výzkumné laboratoři III. Interní gerontologické kliniky FN v Hradci Králové. Poté následují Teoretická východiska, kde autorka nejprve charakterizuje fyzikální a chemické vlastnosti analyzovaných vitamínů (vitamíny skupin A, E a D) a poté se zabývá využitím separačních metod v klinické praxi a výzkumu. Tato kapitola je dále členěná na podkapitoly zaměřené na metody chromatografické, elektroforetické a další, užívané především při úpravě vzorku. Poměrně značná část teoretické části je věnována stanovení vybraných vitamínů v lidském séru a mateřském mléce, včetně v současnosti komerčně dostupných kitů pro chromatografii, imunochemické stanovení atd. Po teoretické části následuje kapitola „Přístrojové vybavení“, kterou by bylo, dle mého názoru, vhodnější zařadit jako součást Experimentální části.

Experimentální část je rozdělena do dvou podkapitol. Cíle první bylo vyvinout a validovat metodu pro stanovení vitamínů A, E, D a metabolitů vitamínu D a také se zabývat optimalizací podmínek pro izolaci těchto látek ze séra. Nejprve byly pro separaci vybraných analytů testovány monolitické kolony a byly vyvinuty a validovány podmínky pro současnou analýzu standardů vitamínů. Poté byly pro separaci vitamínů D, retinolu a α -tokoferolu otestovány kolony s pevným jádrem a jejich účinnost a další vybrané chromatografické parametry byly porovnány s kolonami s plně porézními částicemi. Vybrané podmínky byly validovány. Následovala optimalizace podmínek extrakce vitamínů ze séra, kdy byly srovnávány SPE a LLE. Metoda LLE spolu s analýzou na koloně Ascentis Express RP-Amide byly nakonec použity ke stanovení koncentrací vitamínů D a retinolu v séru dobrovolníků.

Druhá část experimentální práce byla zaměřena na optimalizaci metody extrakce retinolu a α -tokoferolu z mateřského mléka. Byl optimalizován proces deproteinace, saponifikace i LLE a metoda byla nakonec použita pro analýzu několika reálných vzorků mateřského mléka. Tato práce byla publikována v časopise Talanta.

V závěru disertační práce je uveden seznam použitých zkratk, citované literatury (154 literárních zdrojů), publikací, prezentací a řešených grantů. Jako přílohy jsou zařazeny kopie celkem 9 článků publikovaných v impaktovaných časopisech, u kterých se autorka podílela na analytické části a které mají souvislost k textu disertační práce. U jedné z těchto prací je Mgr. Drastíková první autorkou (Talanta, IF: 3,498) a v ostatních případech je součástí autorského kolektivu. Kromě těchto prací je spoluautorkou dalších 7 impaktovaných článků.

Práce je zpracována přehledně a pečlivě, obsahuje pouze malé množství gramatických chyb a překlepů, které jsou běžné pro práce tohoto rozsahu. K drobným formálním chybám patří např. tabulka 8: Prague. Str. 52 a dále (str. 58) seznam standardů a chemikálií je uváděn v tabulkách, které však nemají popisek.

K práci nemám po obsahové stránce žádné významnější výhrady, pouze několik připomínek a námětů k diskuzi.


Dotazy a připomínky:

- Str. 48: Tabulka 6: Kolona Ascentis RP-amide. Jaká je velikost částic u této kolony?
- Str. 55: ...“Parametry, které nesplňují stanovené požadavky, jsou v tabulce 9 přeškrtnuty“...Které to jsou, v tabulce není patrné žádné přeškrtnutí.
- Str. 55-57: V jaké koncentraci byl používán I. S.? Jakým způsobem byly stanoveny LOD a LOQ a podle čeho bylo vybíráno rozmezí koncentrací pro hodnocení linearity?
- Str. 64: Profil gradientu. Gradient se snižujícím se zastoupením silnější eluční složky (acetonitrilu) není obvyklý. Byl nějaký specifický důvod pro jeho použití?
- Str. 69-70: Podmínky SPE extrakce. Po precipitaci ethanolem nanášíte supernatant na kolonku přímo, což znamená, že analyty jsou rozpuštěny v rozpouštědle o poměrně vysoké eluční síle. Nebylo by možné zvýšit výtěžnost naředěním vzorku vodou?
- Str. 69: Uvádíte, že zvýšení účinnosti eluce bylo dosaženo změnou složení elučního činidla (n-hexan/2-propanol), ale v další práci (str. 70, popis validované extrakční metody) jste používali původní eluční postup. Proč tomu tak bylo?
- Str. 73: Pro zlepšení uvolnění analytů z proteinových nosičů byl testován vliv EDTA. Máte nějaké vysvětlení, proč právě EDTA zvýšila uvolnění vitamínů z vazby?
- V práci uvádíte, že provádíte validaci podle FDA. Jakou konkrétní směrnici jste využívali?
- Jaká byla Vaše zkušenost s kolonami Ascentis Express, co se týká životnosti při analýzách biologického materiálu?

Závěr a doporučení: Mgr. Markéta Drastíková prokázala schopnost samostatné vědecké práce, výsledky které získala, jsou nové a originální a většina z nich již byla úspěšně využita v klinické praxi a výzkumu. Z práce i publikační aktivity doktorandky je patrný interdisciplinární přesah i spolupráce se širším výzkumným teamem, jež dovoluje spojit moderní trendy v separačních metodách s požadavky reálné klinické praxe.

Práce plně splňuje požadavky kladené na disertační práce, proto ji doporučuji k obhajobě a udělení titulu Ph.D.

V Hradci Králové: 20.8. 2013



Doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.
Katedra farmaceutické chemie a kontroly
léciv
Farmaceutická fakulta UK