

**Vážený pan**  
**prof. RNDr. Jiří KLIMEŠ, CSc.**  
**předseda oborové rady**  
**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Farmaceutická fakulta**  
**Heyrovského 1203**  
**500 05 Hradec Králové**

**OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE**  
**VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH METOD V KLINICKÉM VÝZKUMU**

Kandidát: Mgr. Markéta Drastíková (roz. Kašparová)

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

Katedra : analytické chemie

Doktorský studijní program: P 5206 Farmaceutická analýza

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

Univerzita Hradec Králové  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra biologie  
Rokitanského 62  
500 03 Hradec Králové

## Úvod:

Předložená disertační práce má v souhrnu 180 stran (včetně seznamu literatury, přehledu publikační činnosti, řešených grantů a konečně 9 příloh, což jsou publikace s podílem na analytické části). Grafické zpracování, úprava i jazyková úroveň jsou na velmi dobré úrovni.

Po obsahu, úvodu a cílech práce předložené k obhajobě, pak následuje vlastní část práce. Práce vysvětluje cíl, který vycházel z konkrétních požadavků- a to - vyvinout vhodnou chromatografickou metodu pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů, ale také ostatních liposolubilních vitamínů v lidském séru pro možné komplexní hodnocení stavu pacienta, adresovaných na Výzkumnou laboratoř III. Interní gerontologicko-metabolické kliniky ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové, kde kandidátka pracovala v průběhu celého doktorského studia.

Právě na vývoji extrakčních metod – jak v séru, tak pro stanovení liposolubilních vitamínů v mateřském mléce (pro potřeby Mléčné banky ve FN v Hradci Králové), jejich validování a zavedení těchto extrakčních metod do rutinní praxe kandidátka pracovala. Dále se spolupodílela na řešení významných výzkumných projektů FN Hradec Králové- a to v rámci spolupráce Výzkumné laboratoře III. Interní gerontologicko-metabolické kliniky zejména ve spolupráci s klinikou Onkologie a radioterapie, kdy jsou v séru pacientů sledovány změny různých parametrů v průběhu léčby. Dále významným projektem bylo zpracování vzorků pacientů léčených LDL aferézou a rheoferézou.

*Lze uzavřít, že práce vysvětluje cíl disertační práce a objasňuje zvolené a použité vědecké metody řešení problematiky a konečně se zabývá výsledky řešení aktuální problematiky s jasným vymezením nových vědeckých poznatků, které jsou přínosem kandidátky.*

Předložená práce je „de facto“ rozdělena na **2 základní hlavní části - a to úvodní část s názvem: 4. Teoretická východiska,** která se skládají z následujících částí – 4.1 stanovované liposolubilní vitamíny (vitamíny A, E, D), jejich fyzikálních a chemických vlastností a dále 4.2 separačních metod – jejich využití v klinické praxi a výzkumu. Jsou zde vysvětleny chromatografické metody, plynová a kapalinová chromatografie, elektroforetické metody a další separační metody, jako např. precipitace, filtrace, centrifugace a extrakce. Dále následuje kapitola – 4.3 stanovení vitamínu D a ostatních liposolubilních vitamínů v lidském séru, která se zabývá klinickým zdůvodněním, složením matrice a možnostmi stanovení. Následuje kapitola 4.4 stanovení retinolu a  $\alpha$  - tokoferolu v mateřském mléce, která je rozdělena na několik částí- kterými jsou: složení matrice a možnosti stanovení.

**Dále následuje vlastní experimentální část, rozdělená na 2. části – a to na Experimentální část I (6)-** zabývající se stanovením vitamínů A, E a D v lidském séru, kterou předchází ještě část 5, týkající se použitého přístrojového vybavení- složeného celkem ze 2 chromatografických sestav (5.1) – a to HPLC (Prominence Shimadzu- Kyoto, Japonsko) a ultra účinné kapalinové chromatografie/UHPLC/ (Nexera Shimadzu- Kyoto, Japonsko) a dále informace o vybavení použitým při přípravě vzorků z kapaliny do kapaliny či na pevnou fázi (5.2).

*Ve vlastní experimentální části I* informuje kandidátka o chromatografických separacích vitamínů (6.1), separacích na monolitních kolonách, na kolonách s pevným jádrem a porézním povrchem, 6.2 o přípravě vzorků před chromatografickou separací – a to extrakcích na pevnou fázi (SPE) a z kapaliny do kapaliny (LLE) se závěrem (6.3) shrnujícím vyvinuté postupy úpravy vzorku (SPE a LLE) na základě přítomnosti interferujících látek, výtěžnosti a preciznosti postupu.

Experimentální část II – se zabývá stanovením retinolu a  $\alpha$  - tokoferolu v mateřském mléce a skládá se z částí- použité chemikálie a příprava roztoků (7.1), chromatografické metody (7.2), vývoje postupu pro přípravu vzorku (7.3), který je rozdělen na podkapitolky – optimalizace deproteinace a saponifikačního procesu, optimalizace LLE.

Dále následuje podkapitola 7.4- optimalizovaný postup přípravy vzorků, sestávající z validace extrakčního postupu a aplikace metody se závěrem (7.5), že vyvinutá extrakční metoda je vhodná pro testování mateřského mléka v mléčné bance a že stanovení vitamínů umožňuje podávat mléko s optimálními koncentracemi retinolu a  $\alpha$  - tokoferolu- podle požadavků u konkrétního novorozence.

Validace metody přípravy vzorku a výsledky statistického hodnocení koncentrací retinolu a  $\alpha$  - tokoferolu v průběhu laktace byly publikovány v r.2012 v časopise TALANTA.

Poslední velmi důležitou část disertační práce tvoří 9 příloh, kterými jsou publikace (13.1-13.9) kandidátky – s podílem její práce na analytické části, např.:

**13.1 Kasparova, M.,** Plisek, J., Solichova, D., Krcmova, L., Kucerova, B., Hronek, M., Solich, P.: Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and alpha-tocopherol in human breast milk. *Talanta*, 93, 2012, 147-152. (*cit.1x, IF-3,498*)

**13.4 Melichar, B.,** Kalabova, H., Krcmova, L., **Kasparova, M.,** Plisek, J., Hyspler, R., Studentova, H., Zedulova, M., Holeckova, P., Pecka, M., Solichova, D.: Urinary neopterin, serum retinol, alpha-tocopherol and homocysteine in breast cancer patients during treatment with bevacizumab and chemotherapy. *Pteridines*, 21 (4), 2010, 87-93. (*cit.1x, IF-0,404*)

**13.6 Melichar, B.,** Kalabova, H., Krcmova, L., **Kasparova, M.,** Malirova, E., Melicharova, K., Pecka, M., Hyspler, R., Solichova, D.: Serum Homocysteine, cholesterol, retinol, alpha-tocopherol, glycosylated hemoglobin and inflammatory response during therapy with bevacizumab, oxaliplatin, 5- fluorouracil and leucovorin. *Anticancer Res.*, 29 (11), 2009, 4813-4820. (*cit.4x, IF-1,428*)

**13.7 Krcmova, L.,** Urbanek, L., Solichova, D., **Kasparova, M.,** Vlckova, H., Melichar, B., Sobotka, L., Solich, P.: HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy. *J. Separation Sci.*, 32, 2009, 2804-2811. (*cit.6x, IF-2,551*)

**13.8 Cincibuch, J.,** Melichar, B., Studentova, H., Kapustova, M., Malirova, E., Solichova, D., Krcmova, L., **Kasparova, M.,** Schneiderka, P., Juranova, J., Sramek, V., Cwiertka, K.: Serum neopterin, retinol and alpha-tocopherol in patients with the carcinoma of the esophagus. *Pteridines*, 20 (2), 2009, 49-53. (*cit.1x, IF-0,379*)

Disertační práce je zpracována pečlivě, čtivě, je přehledně členěna a má logickou návaznost. Literární citace jsou psány ve zkrácené formě, což se připouští, ale podotýkám, že jako oponent bych raději uvítal úplné citace.

Vedle těchto 9 příloh, což jsou publikované články, řešící danou problematiku, vždy s IF v rozsahu od 0,379 do 3,498 (Talanta) je kandidátka 1 x první autor, v dalších publikacích pak spoluautor- a to: 3 x čtvrtý, 3 x šestý, 1 x osmý a 1 x desátý.

Dále jsou uvedeny *ostatní publikace* (celkem 7) vždy s IF v rozsahu od 0,444 do 3,794, kde je kandidátka opět spoluautorkou (má na publikacích podíl- a to: 1x druhý, 4 x čtvrtý, 1 x šestý, 1 x sedmý) a konečně přehled odborných sdělení (celkem 9) - většinou posterů- na domácích i zahraničních konferencích – a to např. v Řecku, Turecku, Finsku,

Španělsku a na Slovensku. Konečně následuje přehled o kandidátkou buď řešených grantových projektech (FRVŠ), či na kterých se jako člen řešitelského kolektivu nebo spoluřešitel grantu spolupodílela- např. IGA MZ ČR, GAUK aj.

#### **Aktuálnost zvolené problematiky:**

Práce významně přispěla k zavedení moderních analytických postupů, umožňujících podstatně rychlejší přípravu vzorků biologického materiálu, méně než 45 minut. Pro stanovení vitamínů D, A, E v séru byly vyvinuty postupně 2 metody, a to- separace na dvou sériově zapojených monolitních kolonách (Chromolith Performance RP-18e), což umožnilo separace během 6,5 min, separace na koloně s částicemi s pevným jádrem (Ascentis Express RP-Amide 75x3mm - s využitím gradientové eluce), což umožnilo separace během 8,5 min. Dále byl vyvinut postup přípravy vzorků pro stanovení retinolu a  $\alpha$  - tokoferolu v mateřském mléce. Práce umožnila především urychlení separací jednotlivých analytů a problematiku lze považovat za vysoce aktuální. Práce má velký význam vzhledem k využití těchto metod především pro praxi a klinický výzkum - pro potřeby různých zdravotnických pracovišť – jako např. Výzkumnou laboratoř III. Interní geronto-metabolické kliniky, Mléčnou banku v Hradci Králové nebo kliniky Onkologie a radioterapie ve Fakultní nemocnici v Olomouci a v Hradci Králové aj.

#### **Cíl disertační práce:**

Cíl předložené disertační práce vyvinout vhodnou chromatografickou metodu pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů, ale také ostatních liposolubilních vitamínů v lidském séru pro možné komplexní hodnocení stavu pacienta včetně vývoje vhodných extrakčních metod – jak v séru, tak pro stanovení liposolubilních vitamínů v mateřském mléce, jejich validování a zavedení těchto extrakčních metod do rutinní praxe, na kterých kandidátka pracovala především, byl splněn. Spolupodílela se dále na řešení významných výzkumných projektů FN Hradec Králové - a to v rámci spolupráce Výzkumné laboratoře III. Interní gerontologicko-metabolické kliniky, kliniky Onkologie a radioterapie a např. Mléčné banky ve FN v Hradci Králové.

#### **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 práci orientovala a navíc k tomu využila i nejnovější podklady získané na základě řešení diplomových magisterských prací a projektů.

#### **Výsledky práce:**

Spočívají hlavně v optimalizovaném postupu úpravy vzorků-

- a) a to v průběhu vývoje vhodné chromatografické metody pro stanovení vitamínů A, E a D v lidském séru, kdy byly testovány různé druhy stacionárních fází – a to na monolitních kolonách a na kolonách s pevným jádrem. Vyvinuté postupy úpravy vzorků (SPE a LLE) byly porovnány na základě přítomnosti interferujících látek, dále výtěžnosti a preciznosti postupu v souladu s doporučeními FDA.
- b) Dále se jednalo o přípravu vzorků pro stanovení retinolu a  $\alpha$  - tokoferolu v mateřském mléce, která zahrnovala optimalizace deproteinace, saponifikace a extrakce. Vše bylo obdobně statisticky ověřeno- pravdivost (dříve správnost), preciznost (dříve přesnost). Výtěžnosti validované metody pro všechny hladiny obou vitamínů, obdobně i preciznost metody byly v souladu s požadavky FDA.

### **Přednosti disertační práce:**

Práce je především kvalitním 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:**

V abstraktu je uvedeno pracoviště, katedra, školitel a název disertační práce- zde bych pro přehlednost uvítal ještě informaci v jakém doktorském studijním programu, abych uvedené nemusel na webové stránce Farmaceutické fakulty UK sám dohledávat. Hodnotu díla však významně nesnižují ani některé drobné nedostatky formálního rázu, např.:

- a) Již v poděkování *se kandidátka dopustila rozporu v uvádění titulů před jménem dle platných pravidel českého pravopisu* (viz psaní titulů dle pravidel českého pravopisu, kdy zkratka vědecko-pedagogického titulu profesor a docent se píše s počátečním písmenem malým – tj. prof., doc.) - **prof.** RNDr. Petru Solichovi, CSc. – **správně** a **Doc.** RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D - **špatně**. Následně kandidátka v textu poděkování pokračuje u všech dalších titulů **Prof. a Doc. velkým písmenem, což je opět nepřesné.**
- b) Další nepřesnost se týká uvádění názvů enzymů, např. str. 44: lipázy, amylázy,..laktoperoxidázy, protože Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (zkr. NC-IUBMB) v Classification and Nomenclature of Enzymes by the Reactions they Catalyse zde za správné považují pouze názvy- lipasy, amylasy,.. laktoperoxidasy. Pro uvádění správných názvů v jazyce českém ještě dále odkazují na [http://natur.cuni.cz/chemie/educhem/ke-stazeni/pokyny\\_zaverecne\\_prace.pdf](http://natur.cuni.cz/chemie/educhem/ke-stazeni/pokyny_zaverecne_prace.pdf) (pozn.: závazná koncovka pro sacharidy je pouze **-osa** - například *glukosa, idosa, gulosa, sacharosa*) - což se týká např. str.45, kde je opět uveden ne úplně správně název *laktóza* aj.

Vzhledem k rozsahu disertační práce se kandidátka neubráníla některým drobnějším tiskovým chybám, což je patrné teprve při, opravdu velmi pečlivém, přečtení textu, které jsou však spíše ojedinělé, např. str. 44 (odst. 1, 5. věta): antimikrobiálních funkce imunoglobulinů IgA, kaseinu,...  $\alpha$  -laktalbuminu **and** laktoperoxidázy jsou umožněny...Na str. 41 nebylo nutné psát název cystická fibróza, sarkoidóza či histoplazmóza s velkými písmeny. Různých menších překlepů je samozřejmě více, např. na str. 119: autor- A. Svobodnfk- má být Svobodník.

### **Dotazy na kandidátku :**

1. Zda se kandidátka někdy pracovala s imunoafinitními kolonkami a mohla by vysvětlit na jakém principu pracují, jaké mají výhody a dále - zda jí není známo, jestli se již nezačínají využívat i pro stanovení vitamínů ?

### **Závěry:**

Kandidátka zpracovala přehlednou a kvalitní disertační práci, 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. Co ale opět vyzdvihují nejvíce a čeho si velmi cením, že má význam nejenom pro výzkum, ale zejména

Oponentský posudek: VYUŽITÍ SEPARAČNÍCH METOD V KLINICKÉM VÝZKUMU

pro praxi, protože výsledky jsou velmi dobře využitelné v klinické praxi – jak k monitorování pacientů s s onkologickými i jinými onemocněními, tak pro potřeby Mléčné banky ve FN v Hradci Králové.

**Proto podle § 47 odst. 4 zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách navrhuji příslušné komisi přijmout její práci jako podklad k udělení titulu PhD.**

V Hradci Králové, dne 18. srpna 2013

Podpis: F. Malíř

