

UNIVERZITA OBRANY

Fakulta vojenského zdravotnictví

Třebešská 1575

500 01 Hradec Králové

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Student: Mgr. Nela Váňová

Název disertační práce: Sledování biomarkerů oxidačního stresu HPLC metodami

Posudek zpracoval: Mgr. et Mgr. Rafael Doležal, Ph.D.

Disertační práce Mgr. Nely Váňové spadá svým charakterem do oblasti vývoje a aplikace bioanalytických metod pro kvantifikaci poškození organismu vlivem oxidačního stresu. Práce v rozsahu 129 stran uvádí v první části základní přehled klasifikace oxidativního poškození biopolymerů působením reaktivních forem kyslíku a dusíku (ROS/RSN). Pozornost je dále zaměřena na sledování spojitosti oxidačního stresu s otravou organofosfáty a patofyziologií Alzheimerovy nemoci (AD). Cílem disertační práce je v první řadě zavedení, vývoj, optimalizace a validace HPLC metod pro stanovení 4 vybraných biomarkerů oxidačního stresu (BOS) v biologických vzorcích. Vyvinuté bioanalytické metody byly následně využity ke stanovení indukce BOS v buňkách HepG2 působením 5 vybraných oximových reaktivátorů inhibované acetylcholinesterasy (AChE) a k monitoringu oxidačního stresu ve vzorcích mozkomíšního moku pacientů trpících AD. V experimentální části je uveden podrobný přehled použitých přístrojů, chemikálií a popis navržených bioanalytických metod. Problematika validace bioanalytických metod je rozvedena v samostatné kapitole. Výsledky disertační práce jsou přehledně ilustrovány četnými tabulkami a obrázky, které jsou důkladně interpretovány a zařazeny do širšího vědeckého kontextu v kapitole Diskuze.

Téma disertační práce reprezentuje důležitou součást hodnocení toxikologického účinku léčiv či jiných látek na organismus prostřednictvím velmi komplexních biochemických procesů s ROS/RSN. Pro stanovení oxidačního poškození byla zvolena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou a spektrofotometrickou detekcí. Autorka disertační práce využívá v podstatě principy klasické chromatografické separace na reverzní fázi s gradientovou elucí. Důležitou roli v bioanalytickém stanovení BOS má také příprava biologických vzorků, která zahrnuje jejich homogenizaci, bazickou hydrolýzu, derivatizaci, čištění metodou SPE a rekonstituci pro LC analýzu. V případě *in vitro* experimentů s HepG2 je rovněž důležité stanovení buněčné viability v prostředí zkoumaných látek.

Výsledky disertační práce ukazují, že zvolená metodika je schopná poskytnout správné, přesné a spolehlivé určení vybraných BOS, pokud jsou dodrženy určité podmínky. Práce však také otvírá některé další otázky, jako je vztah mezi strukturou oximových reaktivátorů AChE a indukcí

BOS. V případě analýzy vzorků mozkomíšního moku byl naopak potvrzen teoretický předpoklad, že u pacientů užívajících memantin se objevuje signifikantní snížení koncentrace 3-NT a zvýšení koncentrace NP-SH.

Text disertační práce je napsán velmi srozumitelným a gramaticky správným stylem. V textu jsem našel pouze výjimečně nějaký překlep nebo narazil na souvětí, která by měla obsahovat čárku. Z literárního pohledu si zasluhuje pochvalu především kapitola Diskuze, která čtivým a obratným způsobem rozebírá výsledky disertační práce. Po formální stránce je disertační práce sestavena logickým způsobem, obsahuje všechny důležité části, odkazuje na relevantní odbornou literaturu a působí na čtenáře uceleným dojmem. Interpretace výsledků a jejich diskuze je vedena kriticky a v souladu s principy zvolené metodiky.

Přestože autorka věnovala svému výzkumnému projektu a disertační práci nepochybně značně úsilí, je možné v rámci kritického pohledu na věc položit několik otázek týkajících šíře a hloubky provedeného výzkumu. Vezmeme-li v úvahu, že práce se zaměřuje na vývoj bioanalytické metody pro stanovení BOS s využitím LC-MS/MS či LC-UV, bylo by možné kupříkladu více prohloubit rešerši odborné literatury zaměřené na používané chromatografické metodiky v této oblasti. Též by mohla být více rozvedena vlastní problematika vývoje a validace bioanalytických metod pro stanovení MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP. Přiměřená analýza chromatografických a fyzikálně-chemických vlastností těchto studovaných analytů by jistě kvalitu disertační práce zvýšila. Na druhou stranu je nutné říci, že pokud první či druhá verze navržené chromatografické metody poskytla uspokojivé výsledky, je otázkou do diskuze, proč by měly být zkoumány jiné metody (např. jiné stacionární a mobilní fáze).

K disertační práci mám několik otázek a připomínek, které by při obhajobě mohly být diskutovány. Jejich počet a obsah však nic neubírá na vysoké kvalitě předložené disertační práce. Spíše je cílem těchto otázek umožnit autorce vysvětlit některá místa jejího díla, k jejichž podrobnějšímu rozboru nezbyl dostatek prostoru.

- Str. 21. V kapitole o oxidačním stresu a jeho hodnocení popisujete mechanismy tvorby ROS. Tvorbě RNS je věnována poněkud menší pozornost. Jaké jsou základní mechanismy tvorby RNS?
- Str. 27. V kapitole o oxidativním poškození proteinů píšete, že zvýšené množství 3-NT v molekule proteinu blokuje reverzibilní fosforylaci tyrosinu. Jaký může být důvod snížení fosforylace u 3-NT?
- Str. 45. V seznamu použitých chemikálií uvádíte NaBH_4 a nazýváte ho borohydrid sodný. Nebyl by vhodnější název tetrahydridoboritan sodný?
- Str. 46. V popisu částí analytického systému uvádíte stručný popis čerpadla. Bylo použité čerpadlo určené pro tzv. nízkotlaký nebo vysokotlaký gradient?
- Str. 48. V popisu MTT testu uvádíte, že intracelulární krystaly formazanu byly rozpuštěny ve 100 μl DMSO a následně byla změřena optická hustota při 570 nm. Jak byla určena koncentrace formazanu a následně viabilita HepG2 buněk za daných podmínek?

- Str. 50. V popisu úpravy vzorku pro stanovení MDA a 3-NT uvádíte použití 250 μ l buněčného homogenátu. Protokol přípravy homogenátu je uveden až ve výsledcích práce. Jaký byl důvod uvedení protokolu homogenizace až na stránce 61?
- Str. 50. Při rekonstituci vzorku po odpaření do sucha přidáváte k odparku 450 μ l octanového pufru. Rozpustil se odparek vždy dokonale? Bylo nutné použít takového množství rozpouštědla?
- Str. 50. V popisu gradientové eluce uvádíte časovou charakteristiku míchání mobilních fází. Jaký byl důvod použití lomené programové funkce s dvěma lineárními úseky o různé strmosti? Srovnala jste tuto gradientovou metodu s např. s jednoduchým gradientovým programem, který má jen jednu vzrůstající část (tj. 1,0 – 8,0 min: 10 – 90 % (v/v) MeOH)?
- Str. 50. Pro HPLC analýzu byla navržena 10-minutová metoda s průtokem mobilní fáze 0.45 ml/min. Bylo při sekvenčním provádění analýz touto metodou dosaženo stabilních chromatografických podmínek?
- Str. 50. Pro kolonu o rozměrech 150 x 3 mm s částicemi 3 μ m používáte nástřikový objem vzorku 20 μ l v polárním rozpouštědle. Zkoušela jste volit i jiné nástřikové objemy?
- Str. 51. V popisu nastavení iontového zdroje pro MS je uveden přehled různým parametru. Bylo nastavení iontového zdroje voleno zkusmo, anebo jste využila nějaký předpis či doporučení?
- Str. 51. U popisu kalibračních vzorků a rozsahu navržených analytických metod uvádíte koncentraci standardů jednotkách nmol na ml a v závorce přidáváte informaci nmol na mg proteinu. Byla tedy měřena hustota buněčných homogenátů a objemová molární koncentrace převedena na hmotnostní molární koncentraci?
- Str. 52. V kapitole o validaci LC-MS/MS metod uvádíte několik sledovaných validačních kritérií. Byla pro volbu těchto kritérií užita nějaká široce uznávaná metodika (např. příručka FDA pro validaci bioanalytických metod, <https://www.fda.gov/media/70858/>)?
- Str. 54. V první větě kapitoly 3.5.11. by zřejmě měla být uvedena zkratka NP-SS-NP, nikoli NP-SH-NP
- Str. 54. V popisu přípravy vzorku pro stanovení NP-SS-NP uvádíte přídavek 100 μ l NaBH₄. Není však uvedena koncentrace a rozpouštědlo NaBH₄.
- Str. 55. V popisu gradientové metody uvádíte poslední krok eluce v časovém rozsahu 5,0 – 4,0 min. Jaké bylo tedy trvání poslední elučního kroku?
- Str. 56. V kapitole o oximových reaktivátorech AChE uvádíte, že čistota použitých reaktivátorů byla pomocí TLC stanovena na 96 – 98 %. Jak byla tato hodnota čistoty získána?
- Str. 57. V popisu indukce oxidačního stresu reaktivátory inhibované AChE uvádíte použití roztoků reaktivátorů o koncentracích, které odpovídají IC₅₀ pro AChE. Zvolila jste tedy pracovní hypotézu, že tato koncentrace reaktivátorů vyvolá v buňkách HepG2 signifikantní indukci indikátorů oxidačního stresu?
- Str. 59. Vzorky lidských mozkomíšních moků byly před zpracováním 5x naředěny. Jaký byl důvod ředění vzorků v tomto poměru? Jaké bylo použito rozpouštědlo?

- Str. 61. V popisu úpravy vzorků uvádíte, že buněčný homogenát z HepG2 byl alkalicky hydrolyzován při teplotě 60 °C. Optimální výsledky, pokud jde o koncentrace 3-NT a MDA, byly pozorovány po 3 h hydrolyzy. Lze říci, jak velký byl rozdíl v koncentracích detekovaného 3-NT a MDA byl pozorován při srovnání např. 2 a 4 hodinové hydrolyzy s 3 hodinovou hydrolyzou?
- Str. 62. Při LC-MS/MS analýzách byla použita jako organická složka mobilní fáze MeOH. Byl MeOH acidifikován přidavkem kyseliny?
- Str. 62. Z důvodu stabilizace a vyšší citlivosti detekce je zavedena derivatizace MDA a GLA. Bylo stanoveno, jak účinná je derivatizace MDA/GLA za daných podmínek?
- Str. 64. V popisu kvantifikace MDA a 3-NT je uvedeno odečtení plochy pík sledovaných analytů, které jsou endogenního původu. Byla tato hodnota endogenní koncentrace pojata jako konstanta? Nebylo by ji tedy možné při kvantifikaci ignorovat?
- Str. 65. Součástí stanovení validačních kritérií bylo určení LOD. Jaká byla pro určení LOD použita definice?
- Str. 68. Jedním z validačních kritérií je uvedena selektivita metody. Byla stanovena též specifita metody? Je možné specifitu odvodit z provedeného určení selektivity metody?
- Str. 70. U studovaných látek bylo rovněž provedeno hodnocení jejich stability v biologické matrici. Jsou procentuální údaje uvedené v Tabulce č. 15 vyjádřením stanovené koncentrace MDA a 3-NT vzhledem k nominální koncentraci na počátku studie stability?
- Str. 78. Na Obrázku č. 12 jsou uvedeny výsledky MTT testu viability HepG2 buněk v prostředí, které obsahovalo vybrané reaktivátory. Jakým statistickým testem byly určeny pravděpodobnosti $p < 0,05$ u stanovených výsledků?
- Str. 84. Na Obrázku č. 14 jsou uvedeny výsledky stanovení NP-SH a NP-SS-NP po provedení experimentů s reaktivátory. Jak si vysvětlujete, že všechny studované reaktivátory potlačují koncentraci NP-SH a zároveň zvyšují koncentraci NP-SS-NP?
- Str. 94. Nejvyšší indukce BOS byla často pozorována u reaktivátoru LüH-6. Podobný reaktivátor HI-6 ale vykázal nižší indukci BOS. Bylo by možné korelovat intenzitu indukce BOS se stabilitou reaktivátorů v buněčném prostředí? Není možné, že by HI-6 byl rychleji biotransformován?
- Na některých místech práce je uvedena jednotka molární koncentrace jako $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, $\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}$, $\text{mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a jinde znaménko součinu v jednotce chybí. Bylo by vhodné jednotky molární koncentrace ujednotit.

Po zralé úvaze a s vědomím omezenosti vlastních zkušeností si dovoluji k disertační práci vyslovit pozitivní stanovisko a **doporučuji ji k obhajobě.**

Datum: 20.5.2019.....

Podpis oponenta: .....