Univerzita obrany
Fakulta vojenského zdravotnictví
Třebešská 1575
50001 Hradec Králové

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

Student:	Mgr. Nela Váňová
Název práce:	Sledování biomarkerů oxidačního stresu HPLC metodami
Posudek zpracoval:	doc. Ing. Miloš Hroch, Ph.D.

Tématem práce předložené Mgr. Nelou Váňovou je studium biomarkerů oxidačního stresu pomocí HPLC a LC/MS metod a vychází z aktuální potřeby dostupnosti baterie analytických metod, které by bylo možné využít ke sledování míry oxidačního stresu na vybraných *in-vitro* a *in-vivo* modelech. Doktorandka se v práci zabývá vývojem a validací metod pro stanovení koncentrací malondialdehydu, 3-nitrotyrosinu a volných endogenních thiolů a disulfidů. Metody jsou následně aplikovány při studiu míry oxidativního stresu vyvolaného na buněčné linii HepG2, po aplikaci vybraných látek ze skupiny oximových reaktivátorů acetylcholin esterázy (AChE), které jsou klinicky využívány při otravách nervově paralytickými látkami. Mimo zavedení výše uvedených metod bylo cílem práce standardizovat postup hodnocení oxidačního stresu na *in-vitro* modelu v rámci posuzování toxicity nově vyvíjených léčiv ze skupiny reaktivátorů AChE a dále tyto metody aplikovat na měření výše uvedených markerů v mozkomíšním moku pacientů trpících Alzheimerovou chorobou.

Disertační práce je členěna obvyklým způsobem a má celkem 129 stran, z čehož 43 stran je věnováno teoretickému úvodu. Teoretická část je zpracována pečlivě a autorka se zde věnuje především mechanismu vzniku a působení oxidačního stresu, jeho vztahu k intoxikaci organofosfáty a látkám používaným jako antidota při otravě těmito látkami. Dále jsou zde probrány možnosti farmakoterapie v případě intoxikace organofosfáty a část úvodu je věnována vztahu oxidačního stresu k Alzheimerově chorobě. Jedinou poznámku, kterou bych měl k této části práce je fakt, že vzhledem k jejímu zaměření bych očekával větší pozornost věnovanou analytickým metodám a novým trendům v této oblasti, které se stále dynamicky rozvíjí.

V druhé části práce pak nalezneme popis cílů práce, použitých materiálů a metodik, popis experimentů, výsledky, diskuzi a závěr. Práce obsahuje více než adekvátní citaci zdrojů, kterých je 229. Z formálního hlediska práce obsahuje minimum překlepů a je přehledně zpracovaná. Připomínky k praktické části práce jsou shrnuty níže.

Připomínky a dotazy

Str. 51. Přístup k přípravě kalibrátorů MDA a 3-NT, tak jak je popsán, není korektní. Při použití uvedeného postupu se mění zastoupení biologické matrice kalibrátor od kalibrátoru. Takže zatímco v případě prvního nenulového kalibrátoru je obsah biologické matrice 99.5 %, což je v naprostém pořádku, pak v případě nejvyššího kalibračního bodu je již zastoupení biologické matrice pouze 20%. To odporuje všem zavedeným doporučením pro přípravu kalibrátorů při měření analytů v biologických matricích! Jaký byl pro to důvod?

Str. 65 a dále. V práci jsou používány validační pojmy jako „*Přesnost*“ a „*Správnost*“. Pokud se budeme držet aktuální terminologie, platné od roku 2009, pak je třeba používat termíny „*Přesnost*“ (dříve „*Správnost*“) a „*Preciznost*“ (dříve „*Přesnost*“).

Str. 67. V rámci validace je popsána metoda stanovení matričních efektů. Zde by bylo vhodné tento test více rozvést. V práci uvádíte, že bylo použito 5 paralelních vzorků. Počet nezávislých paralelních vzorků biologické matrice od různých dárců/zvířat/šarží, doporučený Evropskou lékovou agenturou (EMA 2011), je minimálně šest. O jaké paralelní vzorky HepG2 se u Vás jednalo? Dovedla byste popsat ještě nějaký jiný způsob, jakým se v případě LC/MS ověřuje přítomnost matričního efektu?

Str. 69. Rozštěpený pík GLA. Vzhledem k tomu, že se v prezentované metodě pro stanovení malondialdehydu nevyužívá jeho izotopicky značeného analoga, tak použitý vnitřní standard (GLA) nekompenzuje případné matriční efekty, ale pouze ztráty při přípravě vzorku. V tomto případě je tedy celkem nepodstatné, jakou látku použijeme, pokud má podobné retenční a ionizační chování a podobné chování při zpracování vzorku. Vzhledem k tvorbě splitovaných píků se ukazuje použitý vnitřní standard v kombinaci s nastavením separace jako ne příliš vhodný. Chápu původní motivaci, využít homolog stanovované látky, nicméně na základě výsledků provedených experimentů bych očekával nalezení vhodnějšího vnitřního standardu. Z jakého důvodu nebyla hledána lepší alternativa?

Str.69. Z prezentovaných dat vyplývá, že v „blankové“ matrici získané z buněk HepG2 není malondialdehyd v relevantních koncentracích přítomen. Z vlastní zkušenosti vím, že v podobných biologických matricích, byť „blankových“ (kontrolních), je malondialdehyd přítomen v nezanedbatelné koncentraci prakticky vždy. Jak byste tento fakt vysvětlila?

Str.74. Jaké máte vysvětlení pro pokles koncentrace MDA s časem u vzorků HepG2 inkubovaných s t-BOOH?

Str.75. Jaký je Váš názor na nárůst koncentrace NP-SH s časem v případě nejvyšší použité koncentrace t-BOOH 1000 mmol/L? Při této koncentraci je zde zcela zjevný opačný trend oproti kontrole nebo vzorkům s koncentracemi 100 a 500 mmol/L t-BOOH.

Závěr

Disertační práce obsahově odpovídá schválenému tématu a studentka naplnila vytyčené cíle práce. Využité metody a postupy byly adekvátní, nicméně v některých případech se doktorandka nevyhnula některým poměrně nestandardním postupům (viz. výše), které bude třeba vysvětlit a obhájit. Výsledky její práce byly otištěny ve dvou zahraničních impaktovaných časopisech s nezávislým kritickým recenzním řízením. Doktorandka tedy prokázala dostatečnou schopnost samostatného řešení vědeckých úkolů a jejich prezentace. Přes některé zmíněné nedostatky a po zvážení všech faktů lze práci Mgr. Nely Váňové přijmout k obhajobě.

Práci **doporučuji k obhajobě**.

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav lékařské biochemie
Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové
IČO: 00216208 DIČ: CZ00216208
182

V Hradci Králové dne 10.5. 2019

.....

oponent
doc. Ing. Miloš Hroch, Ph.D.