

Posudek školitele na diplomovou práci Bc. Petry Buriánkové

Analýza, charakterizace a separace dipeptidových derivátů methionin-statinu kapilárními elektromigračními metodami

Bc. Petra Buriánková začala pracovat na své diplomové práci v Laboratoři elektromigračních metod Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky od čtvrtého ročníku svého studia v magisterském studijním programu Klinická a toxikologická analýza, ve školním roce 2006/2007. V jeho průběhu se věnovala převážně studiu teoretických základů kapilárních elektromigračních metod a postupně se seznamovala i s přístrojovým vybavením laboratoře a s metodikou jednotlivých kapilárních elektroseparačních technik, zejména zónové elektroforézy (CZE) a micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Již od počátku projevovala o tematiku diplomové práce velký zájem a snažila se seznámit se s danou problematikou co nejpodrobněji. Zpracovala rozsáhlý přehled využití těchto metod pro kvalitativní i kvantitativní analýzu syntetických peptidových preparátů i pro stanovení biologicky aktivních peptidů v tělních tekutinách a tkáňových extraktech, který tvoří samostatnou přílohu diplomové práce. Separační principy i teorii těchto metod si velmi dobře osvojila a od počátku pátého ročníku se již plně věnovala experimentální činnosti. Cílem její diplomové práce byl vývoj a využití kapilárních elektromigračních metod, zónové elektroforézy a micelární elektrokinetické chromatografie, pro analýzu, separaci a fyzikálně-chemickou charakterizaci biologicky aktivních peptidů, konkrétně dipeptidových derivátů methionin-statinu. Tyto látky jsou na našem pracovišti syntetizovány, purifikovány a testovány jako inhibitory významných proteolytických enzymů, methionin aminopeptidas, které patří mezi klíčové enzymy v biosyntéze bílkovin a mj. se také podílejí na angiogenezi při šíření zhoubných nádorů. Inhibice angiogeneze prostřednictvím inhibitorů aminopeptidas je proto jednou z potenciálních strategií pro léčbu rakovinových onemocnění. Pro biologické testy je nezbytné, aby testované peptidy byly připraveny ve vysokém stupni čistoty, neboť příměsi mohou biologickou aktivitu významně ovlivnit v pozitivním i negativním smyslu. Vypracování nových kapilárních elektromigračních metod pro kontrolu čistoty peptidových preparátů, oproti dosud nejčastěji používaným chromatografickým metodám, je proto velmi žádoucí, neboť elektromigrační metody jsou k chromatografickým metodám vzhledem k rozdílnému separačnímu principu tzv. ortogonální a jsou tak jejich vhodným protějškem resp. doplňkem. Téma diplomové práce je tedy aktuální a prakticky i vědecky významné.

Vývoj nových kapilárních elektromigračních metod pro kvalitativní i kvantitativní analýzu nově syntetizovaných peptidových preparátů představoval náročný úkol, neboť tyto peptidové preparáty byly syntetizovány poprvé a jejich vlastnosti a charakteristiky nebyly známy a jejich standardy nebyly dostupné. Diplomantka se s obtížností tohoto úkolu výborně vyrovnala, postupovala podle racionálně vypracované strategie, kdy podmínky analýzy byly voleny na základě spočtené závislosti efektivního a specifického náboje peptidů na pH. Vzhledem ke specifické struktuře těchto peptidů (volná ionogenní amino skupina na N-konci, neionogenní amidová skupina na C-konci) byly tyto peptidy analyzovány metodou CZE jako kationty v kyselém

oblasti pH, a to v různých elektrolytových systémech, aby se minimalizovala možnost náhodné ko-migrace příměsí peptidových preparátů s hlavními syntetickými produkty. CZE analýzy byly prováděny nejen v klasických, ale nově i v izoelektrických základních elektrolytech, jejichž nízká elektrická vodivost umožnila použití vysokých intenzit elektrického pole a dosažení vysokých separačních účinností (obvykle v řádu stovek tisíc teoretických pater) a krátkých dob analýzy (3-5 min). Metoda CZE byla využita nejen pro analytické účely, ale i pro fyzikálně-chemickou charakterizaci analyzovaných peptidů. Byly určeny efektivní pohyblivosti peptidů v různých elektrolytových systémech při standardní teplotě, 25°C, tj. experimentálně zjištěné hodnoty efektivních pohyblivosti při aktuální teplotě uvnitř kapiláry, která je při různých experimentálních podmínkách různá, byly korigovány na základě experimentálně změřené závislosti vzrůstu teploty na příkonu.

Velká část diplomové práce byla věnována vývoji a testování nových elektrolytových systémů s cílem posoudit jejich schopnost pro dělení směsí dipeptidových derivátů methionin-statinu. Při tom se ukázalo, že větší separační schopnost pro separaci těchto strukturně blízkých peptidů má metoda MEKC než CZE. Poprvé byly v metodě MEKC testovány kyselé izoelektrické pufrů v kombinaci s aniontovým detergentem, dodecylsulfátem sodným, a s organickými modifikátory (methanolem a acetonitrilem), které prokázaly vysokou separační schopnost pro dělení strukturně blízkých peptidů.

Oceňuji, že při vývoji nových metod diplomantka postupovala racionálně a cílevědomě, s využitím svých velmi dobrých znalostí jak v oblasti elektroseparačních metod tak i v obecné analytické chemii a ve výpočetní technice. Její experimentální práce se vyznačovala zručností, vysokou pečlivostí a smyslem pro přesnost. Její pracovní nasazení bylo vysoké, práci si velmi dobře organizovala, takže i když se o přístroj musila dělit s dalšími členy pracovní skupiny, dokázala v daném čase provést mimořádně vysoký počet experimentů. Experimentální data průběžně bezprostředně vyhodnocovala a výsledky přehledně třídila. Velkou pozornost věnovala i sepisování diplomové práce a to po věcné i formální a estetické stránce.

S potěšením konstatuji, že cíle diplomové práce byly úspěšně splněny. Diplomová práce přináší nové cenné poznatky o čistotě a elektromigračních vlastnostech významných biologicky aktivních látek, nově syntetizovaných dipeptidových derivátů methionin-statinu. Vyvinuté metody kapilární zónové elektroforózy a micelární elektrokinetické chromatografie budou dále využívány při analýze těchto peptidů při studiu jejich inhibičních aktivit a antiangiogenezních účinků, které by potenciálně mohly být využity i při léčbě rakovinových onemocnění.

Diplomovou práci Bc. Petry Buriánkové proto jednoznačně doporučuji k obhajobě.

V Praze dne 16.5.2008

RNDr. Václav Kašička, CSc.

Školitel-konzultant
Laboratoř elektromigračních metod
ÚOCHB AV ČR