

Oponentský posudek diplomové práce

Bc. Monika Salfická:

„Validace metody pro stanovení volných metanefrinů v plazmě“

Zadáním předložené diplomové práce bylo vypracovat teoretickou a experimentální část týkající se látek typu katecholaminů, optimalizace a validace metody jejich stanovení. Jelikož tyto látky lze považovat za nádorové markery, bylo zároveň požadováno získané výsledky kriticky zhodnotit a porovnat se zdravotnickým pracovištěm.

Cílem této práce bylo dokončit optimalizaci metody probíhající v rámci projektu Vývoj kitu pro stanovení plazmatických metanefrinů FR-TI4/331 a provést její validaci na kapalinovém chromatografu s elektrochemickou detekcí za použití reálných vzorků plazmy s fyziologickým i patologickým obsahem metanefrinů.

V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše o látkách typu katecholaminů, především o metanefrinech, jejich vlastnostech, výskytu a významu v potravinářství. Bylo zde také rozvedeno využití těchto látek v diagnostice nádorových onemocnění, zejména nádorů nadledvin. Z toho důvodu zde rovněž byla popsána anatomie a fyziologie nadledvin, nádory a jejich léčba, nádorové markery, jejich izolace a detekce z biologických matric. V této části byl zároveň popsán způsob validace analytické metody.

Teoretická část byla systematicky rozdělena do kapitol, ze kterých je patrné o jakou problematiku se jedná, rovněž z této části diplomové práce vyplývá důvod pro stanovení katecholaminů a velký význam pro praxi.

V experimentální části bylo přehledně popsáno přístrojové vybavení, chemikálie, pracovní postupy na přípravu roztoků a podmínky HPLC analýzy.

Následující výsledková část byla věnována analýze výsledků experimentů prováděných během optimalizace přípravy vzorků k analýze, optimalizaci analytické metody a především validaci analytické metody stanovení. Touto metodou byla vysokoučinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí pro stanovení metanefrinů z plazmy po jejich předchozí izolaci extrakcí na tuhou fázi.

Validovaná metoda byla na závěr ověřena analýzou vzorků plazmy. Výsledky stanovení byly porovnány s těmi, které byly změřeny na pracovišti 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

K předložené práci mám následující připomínky, dotazy a náměty k diskusi:

1. V Teoretické části, v kapitole 1.1. s názvem „Nadledviny“ je popsána funkce hormonů kůry nadledvin, funkce hormonů dřeně, stejně tak jako vlastní nádory kůry a dřeně. Vzhledem k tomu, že se katecholaminy a jejich metabolity využívají k diagnostice nádorů dřeně nadledvin, především feochromocytomu, zdá se mi nadbytečné a rovněž od tématu odbíhající, zabývat se významněji kůrou nadledvin a jejími nádory.
2. Opět v Teoretické části, v podkapitole 1.2.3. s názvem „Léčba nádorů nadledvin“ je zmíněno, že po tomografickém vyšetření je nádor chirurgicky odstraněn. Tato informace není zcela pravdivá, protože velké množství nádorů není možné chirurgicky odstranit např. z důvodu možného poškození okolních orgánů. Zde je pak velmi důležité pravidelně provádět stanovení nádorových markerů, za účelem kontroly chování přítomného nádoru. Rovněž se domnívám, že pro uvedenou diplomovou práci je podstatnější oddíl zabývající se diagnostikou než léčbou, protože se bezprostředně týká tématu. Tento oddíl v diplomové práci naopak postrádám.
3. V podkapitole 1.3.2.1. s názvem „Tumorové markery a jejich význam“ se mi zdá nadbytečné šířeji zmiňovat nádorové markery, které se netýkají metabolismu katecholaminů. Naopak v podkapitole 1.3.3.1. s názvem „Katecholaminy a metabolity katecholaminů“ není zcela evidentní, kdy se hovoří o vlastních katecholaminech a kdy již o jejich metabolitech, metanefrinech.
4. Podkapitoly 1.4.2.1 – 1.4.2.4 zahrnují obecný popis preanalytické, analytické a postanalytické fáze laboratorního vyšetření. Zatímco preanalytická část je rozepsána téměř na čtyřech stránkách, analytická fáze zahrnuje pouze extrakci a postanalytické fázi jsou věnovány tři věty. Tento nepoměr může být pro čtenáře zavádějící, stejně jako omezení pouze na extrakci v analytické části.
5. V kapitole 2.6. Validační plán se vyskytuje pojem „obohacený vzorek plazmy“, co to znamená?
6. V podkapitole 3.1.2. uvádíte, že metoda SPE je ovlivnitelná zvoleným sorbentem. Na základě jakých vlastností byly vybrány sorbenty pro testování?

7. Vysvětlíte, prosím, proč v tabulce 3, v podkapitole 3.1.3. všechny centrifugace probíhaly, jak píšete, s nastavenou optimální teplotou, tedy při 4°C, pouze jedna při 20°C?

Shrnutí:

Diplomová práce byla srozumitelně a přehledně sepsána dle jejího zadání. Dané téma bylo teoreticky zpracováno někdy až příliš podrobně, ale metodicky správně a cíl práce byl splněn. Použité přístupy řešení problémů jsou odpovídající a nelze nic namítat ani proti interpretaci výsledků. Experimentální i výsledková část byla velmi pečlivě a systematicky sepsána, doplněna názornými obrázky a přehlednými tabulkami. Veškerá použitá literatura byla dle mého názoru řádně citována (35 citací).

Téma předkládané práce patří k aktuálním a pro potřeby praxe efektivně využitelným. Stanovení tohoto typu látek je velmi přínosné z diagnostického hlediska.

Rozsah předložené práce považuji spíše za nadstandardní.

Podle mého názoru, Bc. Monika Salfická splnila všechny předpoklady pro úspěšné přijetí diplomové práce. Z výše zmíněných důvodů doporučuji tuto diplomovou práci k obhajobě a hodnotím známkou

Výborně

V Praze, dne 26. 5. 2014



.....
RNDr. Alice Brabcová Vránková, Ph.D.

Laboratoře LEM ÚLBLD -VFN a III.interní klinika 1.LF UK v Praze