

## OPONENTSKÝ POSUDEK

Disertační práce

Mgr. Soňa Sechovcová

Využití HPLC/ED k monitorování některých klinicky významných sloučenin.

Disertační práce v rozsahu 150 stran je členěna do 9 kapitol, 8 příloh a 196 literárních citací. Je přehledně uspořádána a podává podrobný obraz o dané problematice.

Zabývá se řešením a optimalizací podmínek metody pro stanovení hladin kys. lipoové /LA/. Ověřením referenčních mezí u dárců krve a poté i u suplementovaných, dobrovolných dárců.

Z klinicky významných sirných sloučenin /aminothiolů/ byly dále stanoveny metodou HPLC/ED hladiny homocysteinu, cysteinu, methioninu a cysteinyl- glycinu. A to u pacientů s onemocněním koronárních arterií.

Problematika LA je v posledních letech v popředí zájmu pro její významné antioxidační účinky s možným antiaterogenním působením. Význam Hcy v organismu je dlouhodobě znám, i jako „nezávislého rizikového faktoru aterosklerózy“. Je však skutečností, že jeho využití v klinické praxi je minimální.

V teoretické části jsou shrnuty údaje o LA, její funkci, metabolismu a vztahu k diabetu a ateroskleróze. Jsou popsány její antioxidační vlastnosti.

Autorka detailně rozvedla problematiku aterosklerózy, ICHS a perkutánní koronární interference. Mimo LA jsou popsány další klinicky významné aminothioly (Hcy, Cystein, Methionin) a jejich vztah k ateroskleróze.

Poměrně stručně jsou následně uvedeny možnosti stanovení LA a aminothiolů (zejména Hcy) v biologickém materiálu.

---

Kap.1. (str.20).....“hlavní příčinou ICHS je oxidační stres“. Vysvětlete proč. A platí toto u každého jedince?

Proč byly vybrány pro sledování aminothioly (Hcy, ...)? A jaké jsou referenční hodnoty? Hcy se v laboratorní ani v klinické praxi nevyužívá. Proč?

Kap.1. (str. 20) ..“indikuje se diabetikům jako doplněk stravy“. Uveďte příklad podávaných preparátů.

Které konkrétní podmínky pro stanovení LA byly testovány při vývoji (resp.ověřování) metody?

Kap.2.4.5.5.(str. 42-44). Byly stenty potažené LA používány i v Pardubické nemocnici?

Kap.2.4.6. (str.47). Hladiny LA – endogenní a po suplementaci. U různých autorů jsou používány rozdílné jednotky ( $\mu\text{mol/l}$ ;  $\text{nmol/l}$ ). Vysvětlete ev. okomentujte.

Kap.2.5.7. (str.68) ...“stanovení B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, kys.listová pomocí HPLC/ED“. Jaké metodiky se používají v praxi?

Experimentální část popisuje konkrétní podmínky stanovení LA (DHLA). Odběry, přístroje, chemikálie, příprava vzorků, analytické parametry metody. Následně podmínky stanovení vybraných thiolů. Ve výsledkové části uvádí finální podmínky stanovení LA v plasmě a to pro dárce bez suplementace a dobrovolníky po suplementaci.

Vybrané aminothioly byly stanoveny u pacientů s onemocněním koronárních arterií, při různém stupni poškození. (akutní, chronická CAD)  
Závěrem je poté sledována dynamika aminothiolů po perkutánní, koronární intervenci.

Kap.4.1. (str.72) ...“byly stanoveny metodou HPLC/ED“. Jde o metodu novou, nebo se ověřovaly optimální podmínky?

Kap.4.1.2. (str.74) ...“suplementovaných dobrovolných dárců krve LA; n=3“. Statisticky nepoužitelná skupina. Proč tak málo jedinců?

Kap.5.1.1. (str.96) ...“kvantifikováno s přijatelnou správností a přesností“. Vysvětlete, co je „přijatelné“ v tomto případě. Porovnejte mez detekce a stanovitelnosti s Vámi naměřenými hodnotami u dárců.

Kap.5.2. (str.98) ...“Kalibrační křivka byla lineární v rozsahu 0,5 – 20  $\mu\text{mol/l}$ . V Kap.5.1.1. je uváděna kal.křivka s koncentracemi LA v  $\text{nmol/l}$ . Vysvětlete.

Kap.5.4.3. Porovnejte zjištěné hladiny aminothiolů s ref. mezemi.

Kap.6. (str.116). Je uváděna a diskutována optimalizace chromatografických podmínek. Ale v Kap.4. nejsou tyto podmínky a jejich porovnávání uvedeny. Vysvětlete.

Předložená disertační práce dokladuje schopnost autorky řešit složitou problematiku s dosahem do klinické praxe. Využívat moderní analytické postupy. Schopnost analyzovat a interpretovat dosažené výsledky. Ty jsou přiměřeným způsobem prezentovány.

Disertační práci proto doporučuji přijmout k obhajobě.

/Studijní a zkušební řád Univerzity Karlovy v Praze 8.2.2018 , obhajoba disertační práce, státní doktorská zkouška/.

V Pardubicích dne 31.8.2018

  
PharmDr. Jiří Skalický, Ph.D.



### Oponentský posudek na doktorskou disertační práci Mgr. Soni Sehovcové

V českém jazyce psaná doktorská disertační práce Mgr. Soni Sehovcové nese název „Využití HPLC/ED k monitorování některých klinicky významných sírných sloučenin“. Jedná se o monografický svazek o 150 stranách, který obsahuje devět kapitol tvořících úvodní literární přehled, popis experimentů, výčet a diskuzi jejich výsledků; disertační práci uzavírají kapitoly Závěr, Přílohy a seznam citované literatury (196 citací).

Předkládaná disertační práce se zabývá vývojem vhodné metody pro stanovení endogenních hladin kyseliny lipoové, ověřením její použitelnosti pro stanovení kyseliny lipoové po podání pacientům, zkoumáním toxicity kyseliny lipoové vůči erytrocytům a výzkumem významu homocysteinu, cysteinu, methioninu a cystein-glycinu v klinické praxi.

Práce Mgr. Soni Sehovcové podává přesvědčivý obraz o spolehlivé odborné kvalifikaci autorky v analytické chemii, elektrochemii a klinické chemii a biochemii. Text disertační práce je psán velmi čtivým a odborně správným jazykem a práce jiných autorů jsou pečlivě citovány. Ojedinelé drobné jazykové chyby mají povahu spíše překlepů či nesprávného použití větné čárky. Po formální stránce je disertační práce (až na některé prohřešky při výsledném formátování textu) provedena velmi kvalitně; drobné výhrady bych měl pouze k následujícím bodům:

1. Strany monografie by měly být číslovány již od první stránky, nikoliv až za obsahem.
2. V textu se místy vyskytuje větší množství výrazů převzatých z cizích jazyků, které však v českém jazyce mají svůj protějšek, tudíž by se slušelo vyvarovat se v česky psaném textu nadužívání takovýchto výrazů.
3. Vícenásobné citace bývá zvykem seskupovat do skupin, proto např. citace <sup>(3) (4) (5) (6)</sup> bych doporučoval uvádět jako citace <sup>(3)-(6)</sup>. Stejně tak soubor citací <sup>(11) (12) (1)</sup> by měl být uváděn v pořadí <sup>(1) (11) (12)</sup>.

**Přírodovědecká fakulta UK  
Katedra analytické chemie**

doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.



4. Na str. 25 by jednotlivé způsoby regulace množství radikálů měly být odsazeny odrážkami.
5. Číslování kapitol do čtvrté či dokonce páté úrovně se obecně nedoporučuje a většinou lze snadno upravit zavedením nečíslovaných kapitol.
6. Bývá zvykem neslabičné předložky přetahovat na další řádek.
7. Při vyjadřování výsledných hodnot jako intervalu spolehlivosti musí mít medián či aritmetický průměr stejný počet desetinných míst jako vyjadřovaná směrodatná odchylka či mez opakovatelnosti (např. na str. 43).
8. V práci by bylo vhodné všechny strukturní vzorce organických sloučenin zapisovat jednotným způsobem, zvláště pokud se vyskytují v jednom obrázku různé druhy zápisu (např. na str. 57).
9. Na str. 80 by na místo 3,3-Sa mělo být 3-Sa.
10. V česky psaném textu je zvykem používat desetinnou čárku, nikoliv tečku (např. v tabulkách na str. 113).
11. Kap. 9: některé citace se formátem vymykají zavedenému stylu (např. 10, 13, 37, 118, 140, 175 apod.).
12. Disertační práce by měla obsahovat také bibliografický přehled uchazečky, aby bylo možné posoudit výstupy, které vznikly z autorčina působení na doktorském studiu.

Tyto formální prohřešky však nijak zásadně nesnižují kvalitu předkládané disertační práce.

K disertační práci mám několik dotazů, které by poukázaly na zkušenost autorky, a tím dokreslily celkový význam předkládané disertační práce, a také abychom se něco více dozvěděli od odbornice na představenou problematiku:

1. Str. 36: co si má čtenář představit pod spojením „silný redoxní pár“?
2. Je možné pro stanovení kyseliny lipoové v biologických tekutinách použít i voltametrické metody (v práci je citována jen jedna taková metoda, což je na takto významný analyt poměrně málo)? Pokud ano, jaké výhody či nevýhody mají oproti HPLC/ED?

**Přírodovědecká fakulta UK**  
**Katedra analytické chemie**

doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.



3. Str. 54 a 56: v tab. 2 je citována práce <sup>(96)</sup>, kde je popisováno použití techniky DPV/ED. Na str. 54 se však u stejné práce hovoří o použití techniky HPLC/ED. Jak má čtenář tomuto nesouladu rozumět? Neodpovídají si ani popisované meze detekce (0,02 ng/ml a 0,2 ng/ml).
4. Je obecně známo, že rtuť a elektrody od ní odvozené (např. amalgamové elektrody) nejsou příliš vhodné pro elektrochemické analýzy při kladných potenciálech, tedy v oblastech potenciálů, při kterých převažuje anodická oxidace analytů a zároveň dochází k elektrochemické k oxidaci samotného materiálu elektrody. Jaká metodika byla zvolena v pracích <sup>(173)</sup> <sup>(174)</sup> <sup>(176)</sup>, které použití takovýchto elektrod popisují?
5. Str. 95: jako jednotku má plocha píku  $y$  a hodnota směrnice v kapitole Linearita (popř. na obr. 21)?
6. Str. 96: v tab. 10 by dle dříve popsaných rovnic měla být hodnota LOQ 3,33-násobek hodnoty LOD. Proč tomu tak není?
7. Str. 121: jaké jiné metody by bylo možné použít pro zjištění cytotoxicity kyseliny lipové kromě zde zmíněné metody vylučování trypanové modři?
8. Nachází v dnešní době HPLC/ED uplatnění v běžné laboratorní praxi (např. při klinických analýzách)?

Závěrem bych rád konstatoval, že předložená disertační práce názorně ukazuje, že její autorka má značné teoretické i experimentální zkušenosti v dané oblasti výzkumu. Práce přináší nové výsledky s nesporným významem pro základní výzkum i pro praktické využití.

Mgr. Soňa Sechovcová takto prokázala své tvůrčí schopnosti a její doktorská disertační práce splňuje požadavky kladené na disertační práci v daném oboru. Proto předkládanou disertační práci plně doporučuji k obhajobě jako základ pro získání titulu Ph.D.

V Praze, dne 30. srpna 2018

doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

**Přírodovědecká fakulta UK**  
**Katedra analytické chemie**

doc. RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.