

Oponent: RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Oponentský posudek k diplomové práci: „*Stanovení kyseliny lipoové v lidské plazmě metodou HPLC*“ autorky Bc. Soni Bencové. Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.

Cílem předložené diplomové práce bylo zavést HPLC metodu stanovení hladiny kyseliny lipoové v lidské krevní plasmě, a to obou jejích forem a také optimalizovat preanalytickou přípravu vzorků. Následným cílem bylo zjištění parametrů získané metody a její využití pro stanovení v praxi.

Diplomová práce má rozsah 72 stran, je doplněna 15-ti obrázky, 3 tabulkami, 1 grafem a 4 přílohami. V textu je citováno celkem 44 zdrojů, kterými jsou v převážné míře zahraniční odborné publikace. Práce je členěna klasicky, v teoretickém úvodu autorka na 34 stranách předkládá souhrnné informace o kyselině lipoové (LA), jejím významu ve vztahu k fyziologii ale i patofyziologii, a dále také data o možnostech a dopadech její suplementace či přehled analytických stanovení. Experimentální část je sepsána na 6 stranách, některé postupy pokusů jsou ale plně vysvětleny až v popiscích grafů či v diskuzi. Výsledková část je sepsána na 6-ti stranách a je dále doplněna o 4 přílohy. Diskuze a závěr jsou uvedeny na pěti stranách textu, kde jsou výsledky zcela dostatečně diskutovány, porovnány s předchozími výsledky autorů popř. s publikovanými údaji a následně přehledně shrnuty.

K předkládané práci mám následující připomínky a dotazy:

1. Formální nedostatky:

- v textu je vhodné užívat daná slova ve stále stejných tvarech, a proto není možné, aby se vyskytovaly průběžně obě slovní formy např.: *plasma X plazma, isokratický X izokratický*
- mezi čísla a jednotkami veličin je nutné v ČJ vkládat mezery, což není, zvláště od poloviny práce, autorkou dodržováno (*str. 32,34,43 – 250ml, 1200mg, 1hodina*)
- v textu se objevují nepřesnosti v pojmech jako „*hladiny krevní glykémie*“ (*str. 13*); „*ve všech třech oddílech kůry nadledvin, tj. glomerulech, tubulárním intersticiu a cévách...*“ (*str. 30*), které by studentka Mgr. studia měla mít vyjasněny
- tabulky jsou číslovány v pořadí 1, 2, 6, 5 (*str. 19,35,51,56*)
- v diskuzi na *str. 63* je odkazováno na *Přílohu 5*, která ale není přiložena
- časté chyby v interpunkci u popisů obrázků, konců vět v textu a začátků souvětí.

2. Literatura

Kvalitu práce mírně snižuje nedůslednost v užívání citací v textu. Autorka zvolila typ citací ve formě pořadového čísla v závorce, přesto se ale v textu objevují citace autorů ve tvaru (*jméno, rok*) popř. pouze s uvedením jména autora, a to bez číslování (např. *str. 38*). Stejně tak se objevují v textu citace, které ale nelze dohledat v seznamu literatury (např. *Zhang, 2008*). Dalším

problémem je nesourodost používaného formátu v Seznamu literatury, kdy autorka často nedodrží zavedený formát citací (*autor, název článku, časopis, rok, číslo a stránky*) stejně jako formátování těchto údajů. Dále bych chtěl také autorku upozornit na nutnost uvádění kalendářního data u citací z internetu.

3. Ostatní připomínky

- 2.pád v anglickém jazyce je nutné tvořit v textu předložkou *of* (viz Summary)
- používání zkratk RNOS, RNS a ROS – mají specifický význam a není možné je zaměňovat
- v grafu č.1 (str. 57) se pravděpodobně nejedná o lineární, ale o polynomickou závislost, při jejímž započítání by bylo možné dosáhnout mnohem lepšího determinačního koeficientu
- tokoferol (str. 15) – v antioxidační tematice je vždy vhodné uvést, o jaký typ tokoferolu se jedná (zda α či γ).

4. Dotazy

a) Autorka v textu několikrát zmiňuje (bez přímé citace – např. str. 15), že lipoová kyselina je schopná sloužit jako antioxidant v obou svých formách (oxidovaná – lipoová kys., LA; redukována – dihydrolipoová kys., DHLA). Z obecně uznávaného principu (a také z autorkou citované literatury) ale spíše vyplývá, že tyto dvě formy LA tvoří redoxní pár, hlavním antioxidantem je kys. dihydrolipoová, a po její oxidaci na LA je rolí LA pouze být po zpětné redukci opět zdrojem pro redukovanou formu (podobně jako je to u jiných antioxidantů : α -tokoferol + tokoferylový radikál; akorbát + dehydroaskorbát; atd.). S tímto i souvisí, že autorka popisuje možnost zpětné redukce glutathionu pomocí lipoové kyseliny (str. 15), ačkoliv je obecně přijímáno, že disulfid glutathionu je zpětně redukovatelný pouze pomocí glutathionreduktasy. Mohla by autorka tato svá tvrzení podložit, popř. vysvětlit?

b) V teoretickém úvodu autorka popisuje oxidačně-antioxidační rovnováhu v buňkách s využitím pojmů jako volné radikály či RNS a ROS. Chtěl bych autorku požádat o vysvětlení těchto pojmů/zkratk, popř. uvedení jejich hierarchie.

c) Při optimalizaci metodiky autorka také testovala vliv poměru redukčního činidla NaBH_4 a LA (str. 54) a určila, že nejlepší poměr je 500:50 (LA: NaBH_4). Z uváděného obr. 12 (str. 54) ale vyplývá, že nejvyšší pík na HPLC záznamu je u křivky příslušející k poměru 1000:50. Chtěl bych opět studentku požádat o možné vysvětlení.

Přes výše zmíněné spíše formální připomínky konstatuji, že diplomová práce Bc. Soni Bencové je zdařilá, popisuje novou metodu stanovení této, pro možnou terapii mnoha onemocnění velmi zajímavé látky, splňuje cíle uvedené v zadání, a proto ji doporučuji k obhajobě a hodnotím ji: **výborně - M**

V Pardubicích 20. 5. 2010

RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.