

## **Posudek na dizertační práci Mgr. Zdeňky Šťastné nazvanou Kapilární metody pro analýzu peptidů a proteinů**

Předkládaná dizertační práce se zabývá problematikou optimalizace separačních a detekčních technik pro analýzu směsí peptidů. Je založena na třech publikacích v prestižních časopisech.

Práce je velmi obsažná.

Pro úvodní rešeršní část dizertantka čerpala z 358 publikací, což svědčí o její snaze hluboce proniknout do dané problematiky. V citacích by se však měly důsledněji respektovat zavedené zkratky časopisů.

V teoretické části se Mgr. Šťastná věnuje jak biochemické problematice s dosahem do medicíny a využití v diagnostice civilizačních chorob, tak přiblížení separačních metod a přístupů k analýze složitých směsí látek. Možná se, v některých případech, dostává do zbytečných podrobností.

Podrobné zpracování experimentální části by spíše odpovídalo charakteru diplomové práce. Navíc se některé informace opakují ještě v části výsledků a diskuze.

Výsledky a diskuze jsou rozčleněny do tří kapitol, tematicky shodných s publikovanými články.

Práce představuje velké množství experimentální práce - biochemické i analytické.

Při tak obsažné práci hodnotím pozitivně, že obsahuje relativně málo překlepů či jiných chyb. Občas bych nesouhlasila s některými českými novotvary, např. obalení kapiláry, separační výkon. Je však třeba říci, že překlad výrazů, které v „odborném slangu“ nepřekládáme, je často problematický. Poněkud bych vytkla některé názvoslovné „přestupky“ a nejednotnosti (celulóza x agarosa, izopropanol x 2-propanol, aj.).

Dotazy resp. příspěvky do diskuze:

Jak ovlivňuje oxidativní stres konečné produkty glykace (AGE)? (s. 20)

Jsou chloridy slabě disociované anionty při pH 3? Proč? (s. 33)

Je chvála CEC opravdu odpovídající jejímu uplatnění v praxi? (s. 47)

U výsledků modifikace BSA za použití oxosloučenin mě překvapil především elektroferogram 11E. Vysvětlení chudým peptidovým profilem souvisejícím s vytvářením navzájem propojených proteinových molekul není zcela odpovídající. Můžete výsledek okomentovat? (s. 82)

Při separaci v CE za použití Au částic se lepší separace v kyselém BGE a při vyšší iontové síle vysvětluje nižší elektromigrační disperzí. Jaký je vliv těchto faktorů na EOF? (s. 95)

Máte vysvětlení, proč je EOF v kapiláře pokryté GNP dvakrát rychlejší než v nepokryté kapiláře?  
Je dimethylsulfoxid vhodný marker? (s. 98)

Lze dokládat separační účinnost počtem píků? (s. 98)

Je opravdu separace na obr. 23A lepší než na 23B? (s. 99)

Je skutečně reprodukovatelnost migračních časů pro vzorek BSA 2 – 5 %? Co se reprodukovatelností myslí? (s. 106)

Uvedené připomínky nemají nikterak snižovat kvalitu předkládané práce, která je velmi pečlivě zpracována a její kvalita je potvrzena třemi publikacemi v renomovaných časopisech. Práce Mgr. Zdeňky Šťastné splňuje požadavky kladené na dizertační práci, a proto ji mohu doporučit k obhajobě a dalšímu řízení.

V Praze dne 14.8.2013



Eva Tesařová

## **Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Zdeňky Šťastné „Kapilární metody analýzy peptidů a proteinů“**

Mgr. Zdeňka Šťastná se ve své práci věnovala studiu glykace proteinů různými oxo-sloučeninami s cílem analyzovat jejich konečné produkty pomocí kapilárních metod – CE a nanoLC v kombinaci s MS detekcí, což je důležitá oblast neboť tyto reakce představují negativní doprovodné jevy u jedné z nejrozšířenějších civilizačních chorob – u diabetu.

Vlastní práce přináší až příliš podrobnou teoretickou část na více než 60 stránkách, ve kterém je shrnuta nejen studovaná problematika, ale i metody používané k jejímu studiu. Následuje experimentální část, která je zaměřena na tři oblasti – i) studium modifikace albuminu oxo-sloučeninami (glukózou, ribózou, glyoxalem a glutardialdehydem), ii) jeho tryptické štěpení, separaci získaných peptidů pomocí OT-CEC s navázanými Ag nanočásticemi a iii) identifikaci derivátů albuminu vzniklých po reakci s ribózou. Zde jsou nejdříve klasicky popsány jednotlivé metody. Co se týče dosažených výsledků, ty jsou dostatečně diskutovány a jsou z nich vyvozeny odpovídající závěry. Tato část si přitom jistě vyžádala obrovské množství práce s modifikačními reakcemi, následnou přípravou vzorků pro analýzy, jejich analýzu CE nebo nanoLC v kombinaci s MS a vyhodnocování naměřených MS spekter.

K vlastní písemné části bych měl několik připomínek:

- str. 26 a dále, pozor na používání pojmu malá versus nízká např. v kombinaci s koncentrační citlivostí
- str. 32 „obalení kapilár“ a dále, vhodnější je „pokrytí kapilár“.
- str. 45 princip CGE je opačný k GPC, tj. elektroforetická mobilita je nepřímě úměrná velikosti respektive tvaru separovaných molekul.
- str. 54 vysvětlíte pojem „kyvety s obalovým tokem“ ?

Vzhledem ke skutečnosti, že dosažené výsledky byly již publikovány a prošly tedy přísným oponentním řízením, měl bych pouze několik otázek:

1. Proč jste si ve studii zvolili jako hlavní monosacharid pro glykace proteinů ribózu, jedná se stejně jako v případě glukosy o aldózu, sice aldopentózu, její hladina v krvi

bude určitě nižší než dalších monosacharidů přijímaných potravou jako jsou fruktóza či galaktóza? Jsou známy jejich glykační produkty?

2. Při glykacích byly používány nefyziologické koncentrace oxo-sloučenin – 100 mM, nemohlo to ovlivnit strukturu výsledných produktů?
3. Přiznám se, že samotného mne nejvíce zaujalo uplatnění zlatých nanočástic u OT-CEC, je něco známo o retenčním mechanismu, který se uplatňuje při separaci peptidů na této stacionární fázi?
4. Ve své práci jste používala kapilární techniky – CE a nanoLC v kombinaci s MS detekcí? Mohla byste srovnat výhody a nevýhody těchto obou instrumentálních přístupů, a kterému byste Vy sama na základě svých zkušeností dala přednost?

Uvedené připomínky a dotazy se netýkají vlastní podstaty práce. Publikace v renomovaných časopisech, které z ní vzešly, svědčí o kvalitě výsledků a potvrzují mimořádnou schopnost Mgr. Zdeňky Šťastné k experimentální vědecké práci. Vzhledem k tomu, že cíle práce byly v plném rozsahu splněny, doporučuji, aby tato byla přijata za základ dalšího řízení a po úspěšné obhajobě byl Mgr. Zdeňce Šťastné udělen titul doktor (PhD).

V Brně 19. 8. 2013



prof. RNDr. Z. Glatz, CSc

Ústav biochemie př.f.MU Brno