



UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta
v Hradci Králové

Oponentský posudek dizertační práce

Název práce: Využití techniky suché kapky krve a metody HPLC-MS v metabolomice
Autor: Mgr. Michal Kopčil
Oponent: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, PhD

Předložená práce se věnuje vývoji třech HPLC-MS metodik pro stanovení aminokyselin, alantoinu a kyseliny močové v bioanalýze využívajících techniku suché kapky krve. V první části disertační práce se autor věnuje charakterizaci cílových analytů, možnostem jejich stanovení a biochemickému významu. Dále popisuje techniku suché kapky krve a hodnotí některé faktory, které tento způsob odběru vzorku významně ovlivňují. V závěru teoretické části jsou diskutovány techniky kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Druhá, experimentální část práce je zaměřena jednak na sumarizaci přístrojů, pomůcek a chemikálií, tak na jednotlivé postupy pro přípravu roztoků a vzorků pro všechny tři metodiky včetně chromatografických stanovení. V poslední kapitole Výsledky a diskuze jsou hodnoceny jednotlivé postupy úpravy vzorku, optimalizace LC-MS metod a stanovení vybraných analytů u dobrovolných dárců. Následují Závěr, Zdroje a Přílohy.

Teoretická část je sepsána velmi pečlivě, přehledně s logickou návazností a téměř bez překlepů. V experimentální části bych preferovala řazení jednotlivých podkapitol dle vyvíjených metodik, současné řazení je pro čtenáře nekomfortní, protože je nucen stále hledat informace v jednotlivých kapitolách a přílohách. Jako součást práce postrádám také seznam jednotlivých publikačních výstupů autora s uvedením jeho podílu na daných publikacích, uvítala bych i více chromatogramů dokumentujících vývoj metody.

Celkově je dizertační práce na velmi dobré vědecké, jazykové a stylistické úrovni. Velice oceňuji možnost využití nových metodik v klinické praxi a snahu klást důraz na komfort pacienta.

K práci nemám žádné zásadní připomínky a proto ji:

DOPORUČUJI K OBHAJOBĚ.

Po přečtení celé práce navrhuji, aby při obhajobě byly diskutovány následující otázky a drobné připomínky.

Připomínky:

1. Při uvedení Souhlasu etické komise na straně 36 je vhodné uvést také jednací číslo schválení pro možné dohledání, dále bych uvedla kromě informovaného souhlasu také Informace pro pacienta a Informovaný souhlas týkající se ochrany osobních údajů (GDPR).
2. Na straně 57 Graf 2 neodpovídá Vašemu tvrzení ze strany 56. Pravděpodobně došlo k záměně barev nebo legendy v grafu. Pokud zvolíte tuto kombinaci barev pro jednotlivé analyty, bylo by vhodné pro sonikaci zvolit barvy jiné.
3. V celé práci jsem nenašla koncentrace jednotlivých kalibračních roztoků, je uveden vždy jen rozsah.
4. U metodiky pro stanovení aminokyselin bych vzhledem k velkému počtu analytů (21) zařadila minimálně ještě jeden vnitřní standard i přes finanční nákladnost, kterou správně zmiňujete.
5. Do práce bych doplnila také několik chromatogramů z vývoje metodik.
6. Na straně 65 bych zvětšila Graf 4, je velmi špatně čitelný.
7. Na straně 65 slovo detegováno prosím opravte na detekováno.
8. Kapitulu 4.3.2. Validace metody..... bych nazvala jinak, je v ní popisována převážně optimalizace metody.

Dotazy do diskuze:

1. Na straně 43 je uvedeno, že kalibrační roztoky byly smíchány s krví v poměru 9:1, na straně 50 uvádíte, že: "Doporučený maximální přírůstek je jeden díl roztoku standardu k devíti dílům plné krve" – zde by měla být uvedena citace. Můžete to prosím vysvětlit?
2. Na straně 58-59 je uvedeno testování stability kyseliny močové a alantoinu ve vzorcích DBS při laboratorní teplotě a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ s následným tvrzením, že vzorky DBS lze tedy posílat do laboratoře poštou. Na straně 68 ovšem tvrdíte, že: „během přepravy mohou být vzorky vystaveny extrémním podmínkám (zvýšená teplota nebo vlhkost vzduchu)“. Byla tedy stabilita DBS pro stanovení kyseliny močové a alantoinu testována i při těchto podmínkách?
3. Nezkoušeli jste při vývoji HPLC metody pro stanovení fenylalaninu a tyrozinu jen upravit stávající metodiku na AK?
4. Strana 41-42 můžete prosím vysvětlit, proč byly roztoky připravovány různými postupy?
5. Byly testovány ME na různých hladinách HCT?
6. Testovali jste také stanovení na reálné kapce kapilární krve?

V Hradci Králové 11.4.2023

doc. RNDr. Lenka Královská Krcmová, PhD

Katedra analytické chemie
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova

Ústav klinické biochemie a diagnostiky
Úsek výzkumu a výuky
Fakultní nemocnice Hradec Králové