



Univerzita Karlova - 1. lékařská fakulta
a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
ÚSTAV DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH
Přednosta: Prof. MUDr. Viktor Kožich, CSc.
Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2
Tel: 224967679, 224967167 (sekretariát); Fax: 22496 7168
Email: Viktor.Kozich@lf1.cuni.cz



Oponentský posudek disertační práce Ing. Magdalény Ovčáčkové: „Charakterizace lipidů v biologických vzorcích s využitím kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie“

Autorka se ve své disertační práci věnuje studiu lipidů s využitím moderních analytických metod. Zvolené téma je pro moderní lipidomiku aktuální. V práci se zabývá třemi metodickými postupy, které využívají hmotnostní spektrometrii (MS). První dva postupy využívají kapalinou chromatografii (LC) k separaci jednotlivých lipidů až na úroveň jednotlivých molekul, třetí postup využívá přímou analýzu bez LC, tzv. shotgun metoda.

První metoda využívá 2D-LC separace. V prvním rozměru jsou lipidy rozděleny na reverzní fázi (RP) dle povahy hydrofobní části molekuly a následně jsou koelující lipidy děleny na HILIC koloně podle povahy hydrofilní části separovaných lipidů. Tento přístup je komplexnější než prostá jednorozměrná separace a umožňuje lepší a detailnější rozdělení studovaných lipidů. Další přínos je v optimalizaci metody s ohledem na robustnost, což není úplně běžné a o to více je prezentovaná metoda cennější.

Druhá metoda využívá jednorozměrnou RP-LC separaci. Autorka si stanovila za cíl posoudit retenční chování lipidů na tomto typu kolon. Výsledkem je popis závislosti t_R na počtu uhlíků a dvojných vazeb v uhlíkatých řetězcích lipidů. Autorka dospěla k závěru, že retenční chování lipidů lze s vysokou mírou přesnosti (chyba do 5-ti %) predikovat a využít k jejich identifikaci v neznámých směsích. Tento poznatek má významný dopad na analýzu neznámých směsí lipidů v různých biologických materiálech a zvyšuje tak jistotu jejich identifikace. Kombinace t_R , přesné hodnoty m/z změřené s vysokým rozlišením, nebo v kombinaci s tandemovou MS umožňuje analyzovat složité biologické vzorky. Přínos tohoto výzkumu je mnohdy podceňován, a o to více jsou jeho výsledky důležité.

Třetí metodický přístup byl založen na principu tzv. shotgun analýzy, jejíž výhodou je zejména jednoduchost. Vzorky jsou do hmotnostního spektrometru dopravovány buď přímou infuzí ze stříkačky s regulací rychlosti průtoku, nebo injekcí optimálního množství vzorku do toku mobilní fáze. Autorka zvolila druhou variantu a využila tento postup ke kvantitativní analýze lipidních extraktů lidských plic zdravých jedinců a pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. Vzhledem k incidenci a medicínské závažnosti nemalobuněčného karcinomu plic je i toto zkoumané téma velmi přínosné. Autorka podrobila změřená data vhodně zvolené statistické analýze, což jí umožnilo nalézt rozdíly v lipidních spektrech u zdravých a nemocných. Takovéto analýzy jsou základem při hledání biomarkerů pro následnou diagnostiku onemocnění.

Autorka vypracovávala svoji disertační práci na pracovišti, které je zaměřeno na lipidomickou analýzu a má za sebou bohatou publikační činnost v této oblasti. Pracoviště je též vybaveno moderními přístroji. Tyto skutečnosti byly pro zvolené téma práce klíčové a je z nich patrné, že byly využity předchozí zkušenosti týmu jejího školitele prof. Ing. Michala Holčáčka, Ph.D.

Autorka uvádí jako podklad své vědecké činnosti články publikované v mezinárodních impaktovaných časopisech, kdy v jedné publikaci je první autorkou a ve dvou publikacích je součástí kolektivu autorů. Další tři články jsou připravovány k publikaci. Dalšími jejími odbornými aktivitami je jedna publikace v národním časopise, přednášky a postery na mezinárodních a národních konferencích. Vědecká činnost doktorandky je různorodá a plně v souladu s předpoklady pro postgraduální studium a přistoupení k obhajobě závěrečné práce. Práce splňuje veškeré standardy odborné práce a doktorandka prokázala svoji způsobilost pro samostatnou vědeckou činnost.

Bez ohledu na nespornou kvalitu a přínos disertační práce mám k práci několik připomínek a dotazů.

Nejzávažnější z překlepů je na s. 67, odst. 1, ř. 11-12 a 20-22. V řádku 11-12 jsou špatně uvedeny rozměry 2D-LC, protože první rozměr separace je prováděn na RP. Na řádcích 20-22 je uvedena nejprve HILIC separace místo RP, o které se zde mluví. Následně je uvedena stejná kombinace HILIC-RP.

Ostatní překlepy:

- s. 26, ř. 6 – deprivatizace místo derivatizace
- s. 38, odst. 2, ř. 2 – má tam být vybočuje
- s. 46, odst. 2, ř. 3 – mitochondrií
- s. 49, odst. 1, ř. 14 – je tam SE a mělo by tam být CE
- s. 57, odst. 2, ř. 2 – místo plazma tam má být plazmy

V některých částech textu teoretického úvodu jsou asi ve dvou pasážích nepřesné formulace, které ovšem nijak nesnižují kvalitu práce. Jedná se o biochemické vztahy, např. cholin není přímo neurotransmitter, ale je prekurzorem neurotransmiteru acetylcholinu. V pasáži popisující tandemovou MS by mohla být detailněji vysvětlena kolizní celá spolu s principem kolizně indukované fragmentace iontů. Zkratky q a Q by měly být v textu vysvětleny (např. s. 31, odst. 2, ř. 4). Vzhledem k obsáhlosti práce by bylo vhodné popsat fragmenty používané při MS/MS analýze a ne pouze zmínku v tabulce P1, která je uvedena zejména kvůli použitým vnitřním standardům.

Co ovšem považuji po formální a věcné stránce za nedostatek práce, je počet a výběr citací v teoretické části. Pasáže, které zabývají se chromatografií, jsou podpořeny převážně citacemi od autorů z Univerzity Pardubice (UPCe), pracemi Doc. Lucie Novákové a pouze jednou zahraniční publikací. Oddíl hmotnostní spektrometrie cituje zejména 1 práci školitele autorky a další 2 citace jsou webové stránky (stránky školitele a zahraniční lipidomický web). Bohužel nejde o přímé odkazy k tématu a čtenář je tak nucen případné informace dohledat. Sekce zabývající se lipidy je též z hlediska citací velmi chudá a je založena převážně na citování Harperovy biochemie. Dále citace 10 na s. 39, ods. 2 je špatně umístěna. V pasáži týkající se iontové mobility cituje jako zdroj stránky www.cancer.org, kde i po zadání ion mobility nejde dohledat relevantní informace.

Na s. 40, odst. 2 obsahuje poslední řádek informaci o roli lipidů při nekróze, což mi není známo. Možná autorka myslela, že lipidy jsou významné složky plátů ucpávajících cévy, což vede k ztrátě zásobení okolní tkáně a její nekróze.

Přes výše uvedené připomínky je teoretický úvod správný bez ohledu na možnou slabší práci se zdroji.



Univerzita Karlova - 1. lékařská fakulta
a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

ÚSTAV DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH

Přednosta: Prof. MUDr. Viktor Kozich, CSc.
Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2

Tel: 224967679, 224967167 (sekretariát); Fax: 22496 7168

Email: Viktor.Kozich@lf1.cuni.cz



Připomínky týkající se výsledků a diskuse:

s. 40, odst. 2, ř. 12 – glykosfingolipidy není správně, protože sfingomyelin nemá cukernou složku stejně jako ceramid, takže správně je – sfingolipidy

s. 69, odst. 1, ř. 9 – sfingolipidy (SP) neobsahují dvě mastné kyseliny, ale pouze jednu, druhý uhlíkatý řetězec je ze sfingoidní báze (aminoalkohol).

Metodická část a posléze i diskuse obsahuje citace prací, které jsou v seznamu literatury označeny jako v přípravě pro publikaci – citace 37, 103 a publikaci 100. První dvě zmíněné jsou citovány v souvislosti s metodickými postupy a jejich validací. Správnost postupů a validaci nelze ověřit, neboť články nejsou zatím publikovány a bylo by vhodné jen v krátkosti popsat klíčové informace z těchto textů. Podobná situace se opakuje ve výsledcích a diskusi.

V metodické části též chybí údaj o objemu směsi chloroform:2-propanol, ve kterých byly extrakty resuspendovány. Čtenář tudíž nemá informaci, jaké množství extraktu je následně analyzováno.

K práci mám následující dotazy:

Autorka zvolila k přípravě vzorků modifikovanou metodu extrakce dle Folche. Modifikace spočívá v kratší době extrakce a zjednodušené přípravě vzorku před extrakcí. Takto zjednodušená metoda v kombinaci s následnými výsledky vyžaduje zodpovězení několika dotazů.

1. Jsou extrahována docela velká množství materiálu, která by měla umožnit analyzovat i lipidy, které se dle autorky v analyzovaném materiálu nevyskytují. Podíváme-li se do tabulky 5, P3 a P4, tak zjistíme, že autorka uvádí, že v lidské moči, krevní plazmě a lidských erytrocytech neviděla jiné sfingolipidy než sfingomyelin. Proč v těchto materiálech nebyly použitými metodami identifikovány i jiné sfingolipidy kromě sfingomyelinu, např. ceramid, ceramid mono- a di- hexosid a sulfatid? Lze to chápat jako jisté omezení použité metody? Proč tabulka P10 shrnující výsledky analýzy plicní tkáně ukazuje očekávané spektrum sfingolipidů včetně výše uvedených?
2. V mozku prasete domácího by mezi sfingolipidy měly být významně zastoupeny i gangliosidy. Byly i tyto lipidy součástí analyzovaných lipidů, nebo je autorka neanalyzovala?
3. Porovnávala autorka lipidy nalezené v biologických materiálech s nálezy v jiných publikovaných pracích? V práci je porovnání s pracemi 6, 45, 104 a 105, což jsou práce publikované týmem prof. M. Holčapka. Zkoušela autorka korelaci výsledků s výsledky jiných skupin zejména zahraničních? Porovnávala autorka výsledky analýzy zdravé a nádorové plicní tkáně, např. s pracemi Z. Takatse?
4. Autorka k analýze využívala pouze spodní organickou fázi a na jednom místě práce uvádí možnost analýzy i vodné frakce. Plánuje autorka v budoucnu analyzovat i horní vodnou fázi? Myslí si autorka, že by se v této fázi mohly vyskytovat lipidy významné pro řešenou problematiku analýzy nádorové tkáně?

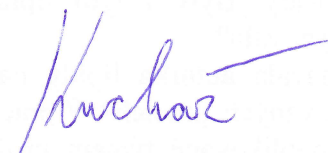
5. Neuvažovala autorka o využití postupu tzv. dilute and shoot, který je asi nejrychlejším možným postupem často diskutovaným v klinické praxi.
6. V práci je popisováno složení mastných kyselin v jednotlivých třídách lipidů. Jedná se téměř výhradně o non-hydroxy mastné kyseliny. Zejména u sfingolipidů jsou ovšem hydroxy-mastné kyseliny v jejich molekulách hojně zastoupeny. Pokud ano, což autorka uvádí v tabulce P10. Bylo zajímavé posoudit, jak mohou hydroxy- skupiny těchto mastných kyselin ovlivnit retenční chování lipidů. Pozorovala autorka jejich vliv na t_R ?
7. Jedním z hlavních přínosů práce je použití t_R jako dalšího identifikačního parametru zejména v neznámých směsích lipidů. Predikce t_R s chybou do 5-ti % spolu s ostatními měřenými parametry je doporučený postup pro identifikaci neznámých lipidů ve směsích. Do jaké míry je tento parametr stabilní a přenositelný i pro predikci v jiných elučních směsích a na jiných RP kolonách?
8. Je přesnost měření m/z s chybou do 5-ti ppm dostatečná pro identifikaci lipidů na základě jejich m/z ?
9. Uvažovala autorka někdy o využití iontové mobility jako separační a identifikační metody lipidů?

Závěr:

I přes některé nedostatky hodnotím práci jako aktuální a řešící důležitá témata lipidomické analýzy využívající hmotnostní spektrometrii v kombinaci s kapalinovou chromatografií a mnohé její závěry za vysoce přínosné. **Práci doktorandky Ing. Magdaleny Ovčáčkové doporučuji připustit k obhajobě.** Předložená disertační práce **splňuje** požadavky kladené na práce obdobného typu a mnohé z výsledků již byly publikovány v impaktovaných zahraničních časopisech.

Doporučuji též, aby byl na základě úspěšné obhajoby předložené práce Ing. Magdaleny Ovčáčkové udělen titul Ph.D. v oboru Analytická chemie.

V Praze 29.9.2016



RNDr. Ladislav Kuchař, Ph.D.
Ústav dědičných metabolických poruch
1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Ing. Magdalény Ovčáčkové

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Charakterizace lipidů v biologických vzorcích s využitím kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Rozsah práce

Předložená disertační práce je vypracována v širokém pojetí a skládá se tedy z úvodu, teoretické části, experimentální části, části výsledků spojených s diskuzí, závěru, přehledu literatury a příloh.

Předkladatelka je první autorkou jedné publikace uveřejněné v časopise Journal of Chromatography A a jedné publikace v Chemických listech, spoluautorkou na dalších 2 článcích, přičemž podíl Ing. Ovčáčkové na výsledcích v jednotlivých publikacích je odvoditelný z obsahu disertační práce. Mírným nedostatkem je nejasnost, která data již byla publikována a které články slouží jako podklad práce.

Celá práce je psána česky, anotace pak v angličtině. Úprava práce plně vyhovuje obecným formálním požadavkům kladeným na disertační práci.

Cíle

Hlavním cílem práce byla charakterizace lipidů v biologických vzorcích. Za tímto účelem předkladatelka optimalizovala extrakční proces lipidů, používala GC-MS a shotgun MS, navrhovala a optimalizovala 2D LC-MS a UHPLC-MS metody, které následně aplikovala na testovací i klinické vzorky.

Teoretická část

Teoretická část je napsaná čtivě a věnuje se jak instrumentaci tak i klasifikaci lipidů. Mírným nedostatkem je absence teorie LC separací vzhledem k tomu, že se práce zabývá vývojem 2D-LC metody. Popis biologických témat je místy až příliš zjednodušen, čímž hraničí s již nesprávným výkladem – např. strana 40 „Ve formě tuku a oleje jsou lipidy skladovány v adipocytech, kde jsou uloženy jako forma energie a kde slouží také jako tepelný izolant některých orgánů a podkoží. Další způsob skladování lipidů v organismu je ve formě lipidových kapiček, které obsahují zejména TAG a steryl estery.“

Experimentální část

Experimentální části téměř není co vytknout. Vzhledem k důležitosti statistického zpracování dat z klinického materiálu by bylo vhodné více rozvést vyhodnocování výstupů vícerozměrných metod. Z praktických věcí by mne zajímalo, jak bylo provedeno spojení UPLC kolon do série a jaká byla stabilita signálu v shotgun metodě při průtoku 3 ul/min.

Výsledky a diskuze

Výsledky jsou prezentovány jasně a srozumitelně a z velké části odrážejí již publikované články. Naopak postrádám diskuzi ve smyslu zobecnění poznatků, návrhů řešení problematických bodů či možnosti uplatnění výsledků v klinické praxi.

Prvním cílem práce byla "optimalizace postupu extrakce lipidů z tělních tekutin a tkání". V experimentální části je podrobně popsán protokol extrakcí, ve výsledkové části je již jen stručně uvedeno, jaké podmínky byly vyhodnoceny jako optimální, ale není uveden postup, jak k tomuto závěru předkladatelka dospěla. Bylo by vhodné minimálně oddiskutovat negativní či pozitivní vlivy testovaných proměnných – teploty, objemu, délky extrakce, a dalších.

Vývoj komprehensivní dvourozměrné LC/ESI-MS metody byl doveden do stavu, kdy byly otestovány základní varianty zapojení aparatury, optimální kombinace kolon, mobilní fáze a detekce. Bylo konstatováno, že metodika má výrazné limitace, hlavně vzhledem k optimalizované RP-UHPLC/ESI-MS metodě. Celý projekt byl publikován v roce 2015 v časopise *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Není ale jasné, zda vývoj metody pokračoval, nebo bude dále pokračovat, a nebo zda je závěrem negativní hodnocení 2D LC-MS přístupu v lipidomice.

Při studiu retenčního chování lipidů metodou RP-UHPLC-MS byla získána velmi zajímavá a důležitá data, která byla dále zpracována do polynomických regresí retenčních časů. Tyto informace budou jistě velmi dobře využitelné při vylepšování metod typu UHPSFC-MS a byli již publikované v časopise *Journal of Chromatography A*. Vzhledem k velmi komplexní separaci lipidů by mne zajímalo, jaký má tato metoda potenciál pro nacházení nových molekul – například estolidů triacylglycerolů (McLean S, Davies NW, Nichols DS, Mcleod BJ. Triacylglycerol estolides, a new class of mammalian lipids, in the paracloacal gland of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Lipids*. 2015 Jun;50(6):591-604. doi: 10.1007/s11745-015-4025-9)

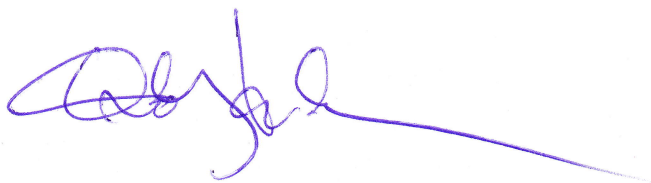
Předkladatelka využila též pečlivě validovanou metodu shotgun MS k analýze klinických vzorků malobuněčného plicního karcinomu. Srovnáním nádorové a nenádorové tkáně byly identifikovány skupiny lipidů, které měly největší podíl na rozdělení vzorků podle typu tkáně, což je velice progresivní přístup s vysokým potenciálem aplikovatelnosti. Jelikož vstupní definice pro PCA analýzu (zdravá-nezdravá tkáň) je založena na empirii chirurga, bylo by vhodné zohlednit i individuální kompozici lipidů každého pacienta tak, aby se projevila i vazba mezi párově odebranými vzorky. Nádorové tkáně byly hodnoceny dle mezinárodní stupnice závažnosti, avšak tato informace nebyla pro vyhodnocení využita. Změnila by se skupina markerů, pokud by se zohlednily výše zmíněné parametry? Práci by velice prospělo, kdyby byla tato část dovedena do stádia publikace již před sepisováním.

Závěr:

Předložená práce řeší aktuální problematiku z oblasti lipidomiky. Studie byly provedeny na pracovišti Univerzity Pardubice, které se dané problematice věnuje dlouhodobě a na vysoké úrovni, s čímž souvisí i použité metody, které jsou na špičkové úrovni a odpovídají současným trendům v dané oblasti výzkumu. Cíle práce byly splněny, zahrnuté publikace, komentáře a výsledky dokazují, že předkladatelka je seznámena s problematikou v dané oblasti a je schopna rozvíjet vědecké přístupy analytické chemie. Disertační práci doporučuji přijmout k obhajobě.

V Praze dne 28. září 2016

RNDr. Ondřej Kuda, PhD
Fyziologický ústav AV ČR v.v.i.
Oddělení biologie tukové tkáně
Václavská 1083
142 20 Praha 4



Ing. Magdaléna Ovčáčíková

Charakterizace lipidů v biologických vzorcích s využitím kapalinové chromatografie a
hmotnostní spektrometrie

Ing. Magdaléna Ovčáčíková se ve své disertační práci věnovala vývoji chromatografických a hmotnostně spektrometrických metod a jejich aplikacím pro analýzu lipidů. Práce navazuje na předchozí systematický výzkum na pracovišti školitele a přináší nové metodické postupy a výsledky. Analýza lipidů je velmi aktuální téma, a to zejména v kontextu biologických věd a medicíny, neboť lipidomické přístupy umožňují odhalovat klíčové role lipidů v patogenezi řady onemocnění. Disertační práce Ing. Magdalény Ovčáčíkové je tedy v širším kontextu příspěvkem ke studiu lipidů v biologických systémech, zejména u člověka.

Klasicky členěná disertační práce má 161 stran včetně příloh a cituje 116 odborných prací. Cíle práce zahrnují optimalizaci přípravy vzorků, vývoj analytických metod a jejich aplikace. Úvodní kapitoly disertační práce jsou sepsány s velkou pečlivostí a podávají detailní přehled o základech použitých technik, lipidech a jejich analýze. Přestože jsou úvodní kapitoly zpracovány přehledně a čtivě, jejich rozsah považuji za zbytečně dlouhý. Řadu informací o metodách lze považovat za všeobecně známé, vhodné spíše pro učební texty. Není zřejmé, proč jsou diskutovány techniky, které v práci nebyly použity, např. ionizační zdroj pro APPI, Orbitrap či iontová mobilitní spektrometrie. Experimentální část je sepsána standardním způsobem dle zvyklostí v oboru. Výsledky práce jsou pak představeny a diskutovány na 24 stranách textu doplněného tabulkami, obrázky a grafy. Z možná až příliš stručné diskuse v kapitole o profilování mastných kyselin nevyplyvá účel těchto experimentů – není jasné, zda bylo cílem optimalizovat metodiku GC/MS, či ji použít na analýzu vybraných vzorků. Naopak důvody pro vývoj komprehensivní dvourozměrné chromatografie a reverzní chromatografie pro velmi účinnou separaci lipidů jsou zřejmé a výsledky získané pomocí těchto metod jsou zajímavé. Uchazečka dobře zvládla náročnou optimalizaci těchto separačních systémů. Poslední část této kapitoly je věnována tzv. „shotgun“ metodě analýzy lipidomu, kterou uchazečka validovala a využila pro porovnání lipidového složení nádorové a zdravé tkáně. Všechny získané výsledky jsou pak stručně shrnuty a zhodnoceny v závěrečné kapitole. Po formální stránce je práce kvalitní, s minimem překlepů a chyb.

K disertační práci mám tyto poznámky a dotazy:

1/ Přestože je práce psaná velmi srozumitelně a odborně správně, našel jsem několik drobných nepřesností: str. 36: dovolil bych si pochybovat o tvrzení, že iontová past je dnes nejčastěji užívaným hmotnostním analyzátozem; str. 38: měřící cela ICR u současných přístrojů

není krychlová; ke stlačování iontů u Orbitrapu nedochází v analyzátoru, ale v tzv. C-pasti (zakřivená lineární past); str. 40, 41: cis-trans izomerie není konformační izomerie.

2/ V Tab. 4 jsou uvedeny relativní koncentrace FA. Jakým způsobem byla provedena kvantifikace? Prosím o komentář k zjištěným FA a jejich koncentracím, např. proč se v moči vyskytuje FA 22:1(13Z) ve velké koncentraci, zatímco v ostatních měřených vzorcích nebyla tato mastná kyselina detegována?

3/ V prvním rozměru 2D chromatografie (RP) se dle očekávání objevují nepolární látky, jako jsou TG a CE na samém konci chromatogramu. Chtěl bych se zeptat, zda dochází ke kompletní eluci všech lipidů? Mobilní fáze na konci gradientu stále obsahuje 0,5 % vody, která může bránit eluci extrémně nepolárních látek.

4/ Závislosti retenčních časů v homologických sériích látek jsou velmi užitečné, v naší laboratoři jsme je v minulosti např. použili např. pro vyloučení falešně pozitivních identifikací u nepolárních lipidů. Můj dotaz směřuje na potenciální využití tohoto přístupu pro identifikaci lipidů s methylovým větvením. Takové lipidy poskytují stejná MS spektra jako jejich nevětvené analogy, retenční časy se však vzájemně mírně liší. Byla by tato cesta k identifikaci větvených lipidů? Jaké je zastoupení lipidů s methylovým větvením ve studovaných vzorcích?

5/ Jakým způsobem byla vyhodnocována intenzita signálu při „shotgun“ analýze v případě, že lipid poskytoval více typů aduktových iontů, např. $[M+H]^+$ a $[M+NH_4]^+$?

6/ Nakonec prosím o obecné porovnání LC/MS a „shotgun“ přístupů pro analýzu lipidů.

Závěrem rád konstatuji, že Ing. Magdaléna Ovčáčková přispěla k rozvoji metodiky analýzy lipidů a její disertační práci hodnotím jako zdařilou. Uchazečka je spoluautorkou čtyřech původních vědeckých prací v impaktovaných časopisech, přičemž u dvou z nich je uvedena jako první autorka. Aktivně prezentovala svoji práci na řadě národních a mezinárodních konferencí. Ing. Magdaléna Ovčáčková tak dostatečně prokázala schopnost a připravenost k samostatné vědecké činnosti, její disertační práce splňuje všechny náležitosti a proto ji **doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 30. září 2016



doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.