

Posudek disertační práce

Využití techniky suché kapky krve a metody HPLC-MS v metabolomice

Autor: Mgr. Michal Kopčil

Vedoucí disertační práce: prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

Oponent: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Předložená disertační práce Mgr. Michala Kopčila je sepsána celkem na 115 stranách. Práce obsahuje 7 kapitol rozdělených do teoretického úvodu, cíle práce, experimentální části, výsledků a diskuse z vlastní experimentální práce, a závěru. Je ukončena seznamem použité literatury, který obsahuje 118 citovaných prací a 15 příloh. Disertační práce má po formální stránce všechny požadované náležitosti a předepsané členění.

Mgr. Michal Kopčil sepsal své dosažené výsledky celkem do třech publikací uveřejněných v časopisech s IF. U jedné z nich je prvním autorem a na zbývajících dvou je uveden jako druhý v pořadí. Kromě toho je Mgr. Kopčil prvním autorem dvou dalších publikací na odlišné téma uveřejněných v časopisech s IF, které jsou v recenzním řízení. Svě výsledky také prezentoval na jedné odborné tuzemské konferenci.

V teoretické části se pojednává o vybraných analytech a jejich využití jako biomarkery pro diagnostiku řady onemocnění. Pozornost je dále věnována využití kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. V další části je popsána technika odběru tzv. suché kapky krve (DBS).

Cílem práce bylo optimalizovat separační metody pro vybrané analyty ve vzorcích krve získané technikou DBS a optimalizovat a validovat tyto metody zahrnující aplikaci na reálné vzorky. Studovanými analyty byly vybrané aminokyseliny, kyselina močová a alantoin. Byly vyvinuty a validovány tři metody HPLC-MS/MS, zlepšena účinnost extrakce a bylo popsáno několik doporučení pro odběr a skladování vzorků. Autor se věnoval také studiu vlivu hodnoty hematokritu na hladiny studovaných analytů. Metody byly testovány na 100 vzorcích DBS od dobrovolných dárců. Závěr práce je shrnut do výsledků a diskuse, kde autor komentuje získané výsledky a popisuje jejich využití v praxi.

V práci jsem našla několik překlepů, chyby ve skloňování, odsazování řádků, několik nesourodostí v textu i nevhodně zvolené odborné termíny. Mezi ty významnější patří především: různé použití zkratky u γ -aminomáselné kyseliny, kdy je pro ni použita zkratka 2-AM i 2-AB (v textu 2-AM, v grafech a tabulkách 2-AB); u kapitoly 1.2 je nevhodně zvolený nadpis kapitoly (místo "Vybrané metabolity" bych zvolila "Vybrané analyty"); v textu je uvedeno různé označení odběrové karty Whatman®903 (str. 24, 25, 36, 38, 43, 45, 46); na str. 46 časový program bych nahradila termínem gradientová eluce; u hmotnostního spektrometru od firmy Shimadzu má být kolizní energie v jednotkách [eV] (str.62); m/z by mělo být uváděno kurzívou; s tím souvisí i kapitola 4.2.1, kdy v Tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty prekurzorových a produktových iontů pouze pomocí označení m/z , a přitom se jedná o hodnotu m/z [M-H], nesprávné označení se vyskytuje i v textu.

Na str. 17 je uvedena světová prevalence jednotlivých onemocnění, věděli byste, jaká je prevalence onemocnění v České republice? Mohli byste prosím vysvětlit, proč jste v textu práce popisoval onemocnění Fenylketonurii a Tyrosinémii typu I a II? Na jakém základě proběhl výběr? Dále by bylo vhodné, když už jste zvolil k popisu onemocnění Tyrosinémii typu I a II, uvést i jejich světovou prevalenci v tabulce (chybí Tyrosinémie typu I).

Na str.23 uvádíte výhody a nevýhody použití techniky suché kapky krve. Mohl byste prosím vysvětlit, proč je uveden malý objem vzorku jak ve výhodách, tak i v nevýhodách? Ve výhodách zmiňujete i transport vzorků, a přitom na str. 49 zmiňujete transport vzorku pomocí pošty jako nevýhodu, protože může být vzorek znehodnocen vlhkostí a teplotou. S tím je spojeno i vaše testování stability kyseliny močové a alantoinu ve vzorcích DBS, kdy testujete pouze skládování po určitou dobu. Bylo by tedy vhodné otestovat i vliv teploty a vlhkosti, aby se mohly nastavit pravidla a standardy pro transport vzorků. Je tedy podle vás transport poštou výhodou nebo nevýhodou? Mezi výhodami máte zahrnutý i neinvazivní odběr vzorku, zvolila bych vhodnější termín: "méně invazivní odběr" pořád se jedná o zásah do lidského organismu. Mohl byste vysvětlit, co znamená nevýhoda citlivost na podmínky měření.

Na str. 25 zmiňujete odběrové karty od firmy Agilent Technologies, které jsou vhodné právě pro techniku DBS. Z jakého materiálu je tato karta vyrobena, v textu toto není uvedeno?

V textu práce uvádíte optimalizaci metodiky pro stanovení aminokyselin, alantoinu a kyseliny močové. Mimo základních 20 proteinogenních aminokyselin, jste zařadili ještě citrulin, γ -aminomáselnou kyselinu a taurin, o kterých v textu dříve nepíšete. V použitých chemikáliích se vyskytují ještě všechny tyto zmiňované analyty, v Tabulce 4, kde zmiňujete jednotlivé navážky analytů a v Tabulce 9, kde zmiňujete MRM přechody už však chybí AMK cystein a neurotransmiter taurin. Následně od této kapitoly dále už ve výsledcích chybí i nejen taurin a AMK cystein, ale i kyselina asparagová. Přitom v závěru píšete pouze o 20 vybraných AMK. Mohl byste prosím vysvětlit, proč byly do studie navíc zařazeny analyty citrulin, γ -aminomáselná kyselina a naopak vyřazeny taurin, cystein a kyselina asparagová?

Závěrem je potřeba konstatovat, že uvedené připomínky a dotazy plynoucí z textu nesnižují úroveň disertační práce Mgr. Kopčila. Autor prokázal schopnost samostatné vědecké práce. Výsledky, které získal, jsou nové a originální.

Předložená práce **SPLŇUJE** podmínky na tento typ práce, a proto ji **DOPORUČUJI K OBHAJOBĚ** jako jeden z podkladů k přidělení titulu Ph.D.

V Hradci Králové 7.4.2023

RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková Ph.D.
Katedra Biochemických věd
Farmaceutická fakulta, UK