

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Ing. Romana Hájka

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

Hmotnostně spektrometrická charakterizace sfingolipidů a glykosfingolipidů v biologických vzorcích

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.

Předkladatel je prvním autorem na dvou publikacích v Journal of Chromatography A a Analytical and Bioanalytical Chemistry a spoluautorem na dalším článku v Analytical chemistry, přičemž podíl Ing. Hájka na výsledcích v jednotlivých publikacích je explicitně definován v seznamu publikovaných prací. Lze předpokládat i autorský podíl na dalších budoucích publikacích laboratoře.

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

Cíle

Hlavním cílem práce byla charakterizace lipidů v biologických vzorcích karcinomu ledvin. Za tímto účelem předkladatel optimalizoval extrakční proces gangliosidů, prozkoumal fragmentační charakteristiky standardů, navrhl separační podmínky pro HILIC a sestavil vhodnou metodu.

Teoretická část

Teoretická část je napsaná ve vhodném rozsahu, zabývá se kapalinovou chromatografií i hmotnostní spektrometrií v detailem respektujících finálně použitou hlavní metodiku, a objasňuje vše potřebné pro pochopení následujících částí.

Experimentální část

Experimentální část je pouze výpis metod a hodnot použitých parametrů. Vývoj optimálních HILIC podmínek je ale rozepsán v části výsledky.

Výsledky a diskuze

Výsledky jsou prezentovány jasně a srozumitelně a z velké části odrážejí již publikované články. Za důležitý přínos analytické chemii pokládám sestavení fragmentačních pravidel složitějších gangliosidů a optimalizaci aditiv pro jejich separaci.

Při optimalizaci separace gangliosidů poklesla intenzita signálu mezi koncentracemi 5 a 10 mM mravenčanu amonného (a následně octanu) o více než 50 % (strana 51). Můžete prosím diskutovat, k jakému jevu dochází a proč je pokles signálu tak dramatický? Pozoroval jste při použití mravenčanu a octanu o vyšších koncentracích tvorbu jejich aduktů?

Po optimalizaci koncentrací aditiv jste optimalizoval pH. Jaké pH měly mobilní fáze na obrázku 23? Uvažoval jste, jaká bude kompozice iontů aditiv při změněném pH s ohledem na pKa acetátu?

Vzhledem k tomu, že optimální separační podmínky jsou různé pro různé složení gangliosidů, domníváte se, že by bylo možno stávající metodu dále rozšiřovat na komplexnější a více větvené struktury?

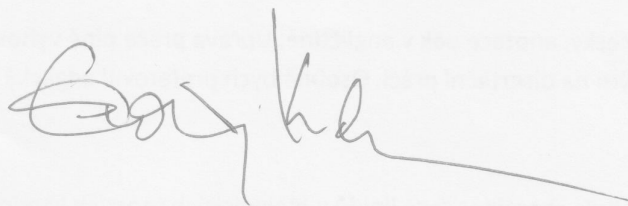
Mohl byste prosím diskutovat, zda/jakou mají gangliosidy identifikované v nádorové tkáni relevanci pro toto onemocnění? Jedná se o nějak specifické povrchové markery? Mohou být součástí například exosomů tvořených ledvinami nebo cirkulujícími nádorovými buňkami, a tedy sledovány ve vzorcích krve?

Závěr:

Předložená práce řeší analytický problém separace a identifikace gangliosidů s aplikovaným přesahem. 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 předkladatel je seznámen s problematikou v této oblasti a je schopen zavádět a aplikovat LC-MS metody. Disertační práci doporučuji přijmout k obhajobě.

V Praze 6. října 2019

RNDr. Ondřej Kuda, PhD
Fyziologický ústav AV ČR v.v.i.
Metabolismus bioaktivních lipidů
Vídeňská 1083
142 20 Praha 4



Posudek na doktorskou disertační práci

Název práce: HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÁ CHARAKTERIZACE SFINGOLIPIDŮ A GLYKOSFINGOLIPIDŮ V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

Autor: Ing. Roman Hájek
Školitel: prof. Ing. Michal Holčapek, Ph.D.
Oponent: doc. Ing. Miloš Hroch, Ph.D.

Předložená disertační práce se zabývá vývojem, validací a aplikací LC/MS metody z oblasti lipidomické analýzy, zaměřené na komplexní analýzu vybraných tříd lipidů se zvláštním zřetelem na gangliosidy. Stručně shrnuto, mezi hlavní cíle patřil vývoj LC/MS metody pro stanovení gangliosidů a popsání jejich fragmentačního a retenčního chování. Dále detailní charakterizace lipidomického složení vybraných biologických matric se zacílením na zastoupení gangliosidů. V neposlední řadě pak aplikace vyvinuté kvantitativní metody ke studiu lipidů nádorové a okolní zdravé tkáně u pacientů trpících karcinomem ledvin.

Předložená disertační práce má celkem 108 stran včetně příloh. Rozsah a členění disertace odpovídá zvyklostem a běžnému standardu. Z celkového rozsahu je 44 stran věnováno teoretické části, dále následuje experimentální část o 3 stranách popisující provedení experimentů a přípravu vzorků. Další 28 stran je věnováno diskuzi výsledků následované závěrem, seznamem publikovaných prací a přílohami.

Ing. Hájek se podílel celkem na 4 impaktovaných publikacích z čehož na dvou z nich je uveden jako první autor. Mimo to se podílel na přípravě prezentací a posterů pro domácí i mezinárodní konference.

Lze konstatovat, že moderní metody kvalitativní a kvantitativní analýzy, kam bezesporu patří i LC/MS jsou nepostradatelnými nástroji v mnoha oblastech medicínského výzkumu, včetně výzkumu nádorových onemocnění. Na základě výsledků prací jako je i tato, lze očekávat mnohem větší využití technik MS i v oblastech, kde se v klinických aplikacích zatím příliš neobjevují.

V případech podobně zaměřeného výzkumu se jedná o poměrně náročný multioborový problém zahrnující nejenom problematiku chemicko-analytickou a medicínskou, ale i matematickou, protože pro spolehlivou interpretaci změřených dat je třeba využít adekvátních statistických technik. V tomto světle shledávám předloženou práci jako velmi přínosnou a téma jako aktuální.

Připomínky

Práce je poměrně přehledná a logicky dělená, nicméně je škoda, že nebyla věnována větší pozornost korekci textu. Autor se bohužel nevyhnul překlepům a na mnoha místech jsou v textu vypadlá slova, nesprávné skloňování, nebo byly použity nevhodné obraty.

Str. 11. Co je to „*intenzita separovaných lipidů*“? Předpokládám, že byla myšlena „*intenzita signálu separovaných lipidů*“.

Str. 19. Ve výčtu detektorů pro HPLC chybí zmínka o MS detektoru. Autor se jimi zabývá podrobně v kapitole 2.2, nicméně na tomto místě by měl být uveden také, s odkazem na podrobnější popis dále.

Str. 20. Ve výčtu modifikací stacionárních fází využívaných v RP by bylo vhodné zmínit i pentafluorofenyl, jako zajímavou alternativu ke zmiňovaným fázím z hlediska její selektivity.

Str. 30. V kapitole 2.2.3 při popisu výpočtu rozlišovací schopnosti hmotnostního spektrometru je použita zkratka RP. Předpokládám, že jde o zkratku vytvořenou z anglického *Resolving Power*. Pominu-li fakt, že je zde použit stejný tvar jako pro označení *reverzní fáze*, bylo by vhodné i tuto zkratku uvést v seznamu na začátku práce.

Str. 31. V kapitole 2.2.3.2 u popisu MS detektoru typu kvadrupól, resp. trojitý kvadrupól by bylo vhodné zmínit kromě měření v režimu skenování a SIM také MRM mód, který je z hlediska využití trojitých kvadrupólů zdaleka nejdůležitějším.

Str. 37. Poslední věta by měla být přeformulována na: „*Větší příjem může vést ke zvýšení rizika aterosklerózy a kardiovaskulárního onemocnění*“

Str. 46. V části „*Použité chemikálie a standardy*“ z textu vypadl použitý stabilizátor chloroformu, je uveden pouze jeho obsah. Přístroj MilliQ na úpravu vody nevyužívá redestilaci.

Str. 38. Proč a čím jsou glycerolipidy bohaté? Jde zřejmě o špatnou formulaci.

Dotazy

V práci je poměrně detailně a systematicky popsán vývoj separační metody, interpretace spekter pro identifikaci gangliosidů, jejich retenční chování a zpracování a interpretace výsledků na zdravé a nádorové tkáni. Na druhé straně, validace metody a zejména její výsledky nejsou v práci podrobněji zmíněny. Proč?

Dovedl byste říci, jakým způsobem by šla Vámi získaná data využít v klinické praxi?

Str. 20. Autor práce uvádí jako jeden z mechanismů separace na RP „Nespecifické interakce“ mezi analytem a stacionární fází. Termín nespecifické interakce je využívá především v oblasti molekulárně biologických metod, nebo např. u imunoafinitních separačních metod. O jaké nespecifické interakce se podle Vás jedná? Jaký termín by se zde hodil lépe?

Str. 42. Nesouhlasím s generalizovaným tvrzením, že cholesterol je hlavní složkou lipoproteinů krevní plazmy. Pro který typ lipoproteinu by toto tvrzení bezzbytku platilo?

Str. 46. Část „Příprava vzorku“. Dle mého názoru nelze použít pouze samotné ultrazvukové homogenizace na větší kusy tkáně, pokud není předem zvětšen povrch vzorku a to zejména v případě, pokud se má vzniklý extrakt použít ke kvantitativní analýze. Běžným krokem při ultrazvukové homogenizaci je nejprve „rozpráškování“ tkáně zmrazené tekutým dusíkem např. v třecí misce nebo jiný způsob rozmělnění a teprve poté ultrazvuková homogenizace ve vhodném prostředí. Byla tkáň před homogenizací ultrazvukem nějakým takovým způsobem předem upravena, případně byl uvedený postup nějakým způsobem validován?

Str. 49. Na základě *in-silico* modelování disociačních křivek vybraných gangliosidů byl pro jejich separaci vytipován vhodný rozsah pH mobilní fáze 5 - 10. Bylo by dle Vašeho názoru vhodné provádět analýzu při pH na horní hranici tohoto rozsahu? K čemu by mohlo při vysokém pH dojít (ve vztahu k analytu)?

Str. 54. Na začátku kapitoly 4. 1. autor uvádí, že na základě provedeného *in-silico* modelování bylo pro optimalizaci navrženo jako vhodné rozmezí pH 5 - 10. V kapitole 4.1.1 je ale uvedeno, že prakticky se testovalo rozmezí 3.0 – 6.5. Proč není tato změna nikde v textu diskutována?

Str. 73. Je podle Vás koeficient determinace (R^2) vhodným ukazatelem správné volby kalibračního modelu, respektive kvality proložení křivky kalibračního modelu kalibračními body.

Závěr:

Lze konstatovat, že všechny body vytýčené v zadání disertační práce byly beze zbytku naplněny. Na předložené disertační práci oceňuji systematický přístup, jakým se autor zhostil vývoje metody pro multikomponentovou lipidomickou analýzu komplexních biologických materiálů. Odhlédnu-li od některých nejasností, které budou, jak předpokládám, zodpovězeny během obhajoby práce, většina připomínek k textu se v zásadě týká zejména stylistiky a nijak nesnižují její význam. Předkladatel prokázal schopnost samostatné vědecké práce, jak dokazují kvalitní publikace v uznávaných zahraničních časopisech s IF, kde prošly náročným recenzním řízením.

Na základě výše uvedeného se domnívám, že **předkladatel splnil všechny povinnosti a předpoklady pro získání doktorského titulu a proto předloženou práci doporučuji k obhajobě.**

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav lékařské biochemie
Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208

V Hradci Králové dne 4.10. 2019

.....
doc. Ing. Miloš Hroch, Ph.D.
Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Ústav lékařské biochemie

Ing. Roman Hájek

Hmotnostně-spektrometrická charakterizace sfingolipidů a glykosfingolipidů
v biologických vzorcích

Disertační práce Ing. Romana Hájka se zabývá analýzou gangliosidů v biologických vzorcích. Jedná se o strukturně velmi variabilní glykosfingolipidy, které obsahují kyselinu sialovou. Tyto lipidy se vyskytují v tkáních i tělních tekutinách, zejména pak v nervovém systému. Podílejí se na patologii mnoha nemocí a jejich biologické funkce jsou předmětem intenzivního zkoumání (přibližně 400 publikací ročně). Téma práce je proto vysoce aktuální a relevantní k současnému biomedicínskému výzkumu.

Klasicky členěná disertační práce má celkem 108 stran včetně příloh, obsahuje 42 obrázků a cituje 100 literárních pramenů. Po krátkém úvodu následuje teoretická část, která se obšírně věnuje metodám kapalinové chromatografie, hmotnostní spektrometrie a postupům přípravy vzorků používaným v lipidomické analýze. Principy instrumentálních metod jsou zde diskutovány možná až příliš obecně, některé kapitoly považuji za zbytečné – jsou to ty, které se zabývají technikami, které při experimentální práci použity nebyly (např. magnetický sektorový analyzátor nebo iontová cyklotronová rezonance). Naopak více prostoru mohlo být věnováno roli gangliosidů v biologických systémech. Experimentální část je poměrně stručná, ale poskytuje dostatek informací o použitých postupech. Výsledková část se nejdříve zabývá optimalizací podmínek analýzy a detailním rozбором fragmentačních spekter gangliosidů. Zde bych chtěl ocenit pečlivost a důkladnost, s jakou byla spektra interpretována a prezentována v disertační práci. Následující kapitoly jsou věnované aplikaci optimalizované metody na různé typy biologických vzorků. Podrobně byla zpracována studie, ve které byly pomocí validované metody porovnány lipidy nádorové tkáně okolní zdravé tkáně u karcinomu ledvin. Podrobné statistické vyhodnocení dat pak ukázalo rozdíly v zastoupení lipidů. Závěrečná kapitola je stručným souhrnem dosažených výsledků. Následuje seznam publikačních výstupů. Je škoda, že součástí práce nejsou kopie publikací autora. Poslední část disertační práce tvoří přílohy, které přinášejí doplňující spektra a informace včetně rozsáhlého seznamu všech lipidů nalezených v biologických vzorcích. Po formální stránce obsahuje disertační práce řadu chyb a formulačních neobratností až nepřesností. Autor se nevyhnul chybějícím slovům, nesprávnému číslování obrázků ani pravopisným chybám. Seznam těchto drobných prohřešků je uveden v příloze posudku.

Celkově hodnotím disertační práci velmi kladně. Analýza gangliosidů je kvůli jejich obrovské strukturní variabilitě obtížná, a to jak z pohledu metodiky, tak interpretace dat. Autor se tohoto úkolu zhostil se ctí a podařilo se mu nejen vypracovat kvalitní analytickou metodu, ale i získat cenná biologická data. Výsledky své práce publikoval ve formě tří odborných článků v prestižních analytických časopisech, čtvrtý článek je v přípravě. U dvou článků je prvním autorem. Slovní komentář k jednotlivým publikacím uvedený v disertační práci svědčí o tom, že přínos Ing. Romana Hájka byl zásadní. Výsledky jeho práce byly rovněž prezentovány na několika národních i mezinárodních konferencích.

K práci mám následující dotazy:

1/ Distribuční diagramy na Obrázku 22 udávají poměrná zastoupení jednotlivých forem gangliosidů. U takových diagramů by měl součet hodnot v každém bodě pH dosahovat hodnoty 1, resp. 100 %. To ovšem pro některé body na tomto obrázku neplatí, např. pro pH blížící se hodnotě 0 u GD1 a GM1, nebo pro pH kolem hodnoty 3 u GT1. Čím to je? Předpokládám, že pro výpočet bylo nutné do programu zadat hodnoty disociačních konstant gangliosidů. Jak byly tyto hodnoty získány?

2/ Při optimalizacích mobilní fáze byla testována rozmezí pH 3,0 – 5,8, a 3,0 – 6,5. Zajímalo by mne, zda pozorované nábojové stavy gangliosidů ve spektrech odpovídaly distribuci iontů vypočítané programem Marvin či nikoliv. Pokud ne, jak to lze vysvětlit? Podle teoretických výpočtů při pH > 5 má převládat [M-3H]³⁻, změřená spektra však naznačují spíše přítomnost [M-2H]²⁻.

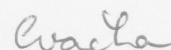
3/ Interpretace spekter naznačená v obrázcích je dle mého názoru správná a jednoznačná, nicméně se někdy opírá o ionty, jejichž intenzita se blíží úrovni šumu (např. m/z 726,6 v Obr. 30, m/z 581,2 v Obr. 32, m/z 1091,7 v Obr. 33 apod.). V obrázcích bohužel nejsou výřezy se zvětšenými oblastmi spekter, proto nelze posoudit relevanci těchto signálů. Prosím o doplňující komentář k využití takových iontů k interpretaci spekter. Podařilo se na základě spekter identifikovat všechny gangliosidy, nebo byly ve vzorcích i další, u nichž se identifikace nezdařila?

4/ Extrakční účinnost pro některé třídy lipidů se pohybovala kolem 50%, to znamená, že zhruba polovina přešla do vodní fáze, zatímco druhá polovina zůstala ve fázi organické. Zajímalo by mne, jestli byl pozorován rozdíl v zastoupení molekulových druhů dané třídy ve vodné a organické fázi (např. delší acylové řetězce v organické fázi).

5/ V experimentální práci byl využit přístroj umožňující iontově-mobilní experimenty (Synapt G2-Si HDMS). Bylo zvažováno použití iontové mobility pro analýzu gangliosidů? Díky různému počtu objemných cukerných jednotek by iontově-mobilní separace mohla být pro tyto analyty užitečná.

Závěrem rád konstatuji, že předložená disertační práce Ing. Romana Hájka je kvalitní a přináší nové poznatky v oblasti analýzy gangliosidů a lipidomiky renálního karcinomu. Výsledky byly publikovány v renomovaných odborných časopisech a prezentovány na konferencích. Dle mého názoru uchazeč dostatečně prokázal připravenost k samostatné tvůrčí činnosti, a proto jeho disertační práci **doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 15. října 2019



.....
doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Seznam drobných nedostatků a chyb

Str. 11: Chybí slovo na konci věty (5. řádek). Chybějící písmeno ve slově „ionzací“ (8. řádek). Nesprávný výraz „povrchově porézní kolona“ (14. řádek).

Str. 11: Pravopis „lipidů ze sedmy tříd“ (7. řádek). Použití anglických slov „box ploty“ a „fold change“ (8. a 9. řádek).

Str. 15: Definice lipidů na základě rozpustnosti v organických rozpouštědlech a nerozpustnosti ve vodě je často používaná, ale nepřesná a ne zcela vhodná v kontextu této práce, kdy autor izoloval polární lipidy z fáze vodné (1. - 2. řádek). Lipidomika bývá chápána obecněji jako vědní obor spíše než analýza (5. řádek). Chybná formulace „ znalosti jejich mechanismu je velmi důležité“ (12. řádek). Neúplná informace „Shotgun přístup využívá tandemový hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólovým analyzátozem“ – tento přístup může obecně využívat i jiné typy analyzátořů (17. -18. řádek).

Str. 18: Chybějící písmeno m ve slově „kontrolující“ (1. řádek). Vnitřní průměr kolon může být i menší než 1 mm (12. řádek). Chybějící mezera (poslední řádek).

Str. 20: Neobratná formulace „mobilní fázi je spojení směsi vodné složky a organických rozpouštědel“ (9. řádek). Chybný název sloučeniny „metanol“ (11. řádek). Nesprávná terminologie „polárních silách“ (21. řádek).

Str. 23: Nejasné, co je myšleno výrazem „jejich částí“ ve větě „Hmotnostní spektrometrie ... je ... metoda sloužící k určování molekulové hmotnosti atomů, molekul a jejich částí po převedení na ionty. Nepřesný výraz „iontové techniky“ – má být „iontové optiky“ (19. řádek).

Str. 24: K větě „Při výběru ionizační techniky je důležité brát v potaz těkavost analyzovaných látek, molekulovou hmotnost, a hlavně jejich tepelnou stabilitu.“ bych doplnil, že tyto parametry samy o sobě nemusí stačit ke zvolení vhodné ionizační techniky. Zásadní je znalost chemické struktury analytů, na základě které lze navrhnout vhodný ionizační mechanismus, a tedy i ionizační techniku. (13. – 14. řádek). Neobratná formulace „technikou, která má stále svoji oblast pokrytí“ – spíše „... využití“ (předposlední řádek).

Str. 26: Nepřesná formulace „APCI není vhodná pro analýzu biomolekul“. Lipidy jsou typické biomolekuly a některé z nich se pomocí APCI analyzují velmi snadno. Autor měl zřejmě na mysli „ ... biomakromolekul“ (15. řádek).

Str. 28: Autor zmiňuje Nobelovu cenu udělenou K. Tanakovi za MALDI v roce 2002. (4. řádek) Bylo by vhodné u této příležitosti zmínit i jména dalších dvou pionýrů v této oblasti, tj. Franze Hillenkampa a Michaela Karase. Stejně tak mohl být v případě elektrospreje zmíněn John Fenn. Vysvětlení 3 typů MALDI zdrojů by bylo přesnější s využitím hodnot tlaků v iontovém zdroji při dané technice. Stávající vysvětlení je nepřesné, protože „vakuum“ je také „snížený tlak“ a pojem „okolní tlak“ závisí na tom, co je myšleno okolím. (7. – 9. řádek). Věta „MALDI ionizace se používá pro molekuly s velkou molekulovou hmotností jako jsou biopolymery, syntetické polymery, lipidy atd“ není vhodně formulována, neboť lipidy obvykle nejsou látky s „velkou molekulovou hmotností“ jako např. polymery. (9. řádek).

Str. 29: Elektrostatický analyzátoř využívá zakřivení dráhy iontů v elektrickém poli, ale není to hmotnostní analyzátoř. Filtruje ionty na základě jejich kinetických energií (tedy nedělí ionty podle hodnot m/z , jak je tomu u hmotnostních analyzátořů).

Str. 30: Přístroj Orbitrap by měl být psán s velkým počátečním písmenem (komerční název přístroje), obecně jde o orbitální past (12. řádek).

Str. 31: Nepřesná formulace „kruhového a hyperbolického průřezu“ - spíše „kruhového nebo hyperbolického průřezu“ (7. řádek).

Str. 33: Nepřesná formulace „Reflektron je soustava mřížek“ - spíše „ ...soustava prstencových elektrod“ (7. řádek).

Str. 34: Nepřesná formulace „Následně jsou pomocí Fourierovi transformace tyto frekvence přepočteny do stupnice m/z .“ (poslední řádek) Fourierova transformace nepřepočítává frekvence na m/z , ale rozděluje komplexní frekvenční signál na jednotlivé frekvence, ze kterých je složen.

Str. 35: V názvu kapitoly i v následujícím textu je chybně použit termín „mobilní“ (tj. přenosná) namísto správného „mobilitní“ spektrometrie. (1. a 2. řádek). Překlep „Technickým“ – má být „Technických“ (9. řádek). Překlep „lonty jsou vystaveny vysokým potenciálem elektrického pole“ (19. řádek).

Str. 36: Nepřesná formulace „Skládají se z hydrofobního uhlovodíkového řetězce a hydrofilní karboxylové kyseliny...“ – spíše „... karboxylové skupiny“ (21. a 22. řádek).

Str. 42: Na Obrázku 21 je spíše struktura isoprenu než izoprenové jednotky.

Str. 44: Nelogická formulace „... se extrahované látky mohou dělit ... mezi ... dvě mísitelné kapaliny (butanol/metanol) (6. řádek).

Str. 45: Nepřesná formulace „V záporném záznamu iontů“ – spíše „V záznamu záporně nabitých iontů“ (4. řádek).

Str. 48: Nepřesná formulace „v rozsahu 50-3000 m/z “ – spíše „v rozsahu m/z 50-3000“, protože m/z je označení veličiny a ne jednotky – měla by tedy být psána před číslem (8. řádek).

Str. 54: Nelogický odkaz na obrázek „Izomery GD1a a GD1b nebyly separovány a eluovaly v jednom píku při pH 3 (Obrázek 27 A),“ – na Obrázku 27 A však žádná separace ukázána není.

Str. 57: Nepřesná formulace „Správnost určení elementárního složení byla v průměru 3,1 ppm“ – zřejmě myšleno „Správnost určení hodnoty m/z ...“ (7. řádek).

Str. 60: Přehozené číslování obrázků.

Str. 65: Chybná interpretace iontů m/z 1906,0 a m/z = 1864,0. Jedná se o jednu nabitou ionty $[M-H-NeuAc]^-$ a $[M-H-NeuAc_2]^-$ (6. řádek).

Str. 66: Přehozené číslování obrázků.

Str. 68: V Tabulce 4 by měl být poslední sloupec označen „ m/z “, nikoliv „ $\Delta m/z$ “

Str. 68: Pravopisná chyba „Ve vzorku se dále vyskytovali polární fosfolipidy...“(první řádek odstavce)

Str. 68: Nedokončená věta „... z důvodu nízké rozlišovací.“(předposlední řádek)

Str. 72: Z popisu Tabulky 6 není zřejmé, co čísla v tabulce udávají (až v textu lze dohledat, že to jsou počty lipidů).

Str. 74: Překlep: „Přenos vzorku ... bylo do 3 %.“ (9. - 10. řádek)

Str. 75: Z popisu obrázku není zřejmé, zda chromatogram odpovídá extraktu zdravé tkáně, nádorové tkáně, nebo smíšenému vzorku obou tkání.