

Quantitative lipidomics: High-throughput analysis of clinical samples of body fluids

Disertační práce Ing. Michaely Chocholouškové se zabývá kvantitativní lipidomickou analýzou aplikovanou na klinické vzorky pacientů trpících různými typy rakovin a na kontrolní vzorky zdravých dobrovolníků. Lipidy se uplatňují při vzniku a průběhu mnoha chorob, a proto může být lipidomická analýza vhodným nástrojem pro jejich výzkum i diagnostiku. Disertační práce je založena na 4 již publikovaných pracích a 4 manuskriptech v recenzním řízení, jejichž jednotlivým prvkem je vývoj, aplikace a vzájemné porovnání optimalizovaných a validovaných lipidomických postupů.

Disertační práce je napsána v anglickém jazyce a je pojata moderní formou jako soubor publikací opatřený teoretickým úvodem, stručným komentářem k jednotlivým článkům a shrnujícím závěrem. Celkově má 57 stran textu a velmi rozsáhlou přílohou část čítající 265 stran s plnými verzemi článků. V disertační práci je citováno 102 literárních pramenů. Oceňuji zařazení kapitoly, které shrnuje autorčiny vědecké publikace a prezentace, stáže, ocenění a absolvované kurzy.

Úvodní teoretická část je psána čtivě, výstižně a podává ucelený a vyvážený přehled o lipidomice jakožto vědním oboru i o metodách lipidomické analýzy. Pozornost je věnována předúpravě a zpracování vzorku, hmotnostně-spektrometrickým a chromatografickým metodám, způsobům kvantifikace i zpracování dat a validacím analytických metod. Text je vhodně doplněn názornými obrázky. K úvodní části nemám zásadní odborné připomínky. Následuje kapitola, kde jsou specifikovány cíle disertační práce a kde je podán přehled dílčích směrů výzkumu. Výsledková část pak stručně komentuje výsledky dosažené v daných oblastech a specifikuje články, které se k těmto oblastem vztahují. Závěrečná kapitola je pak shrnutím dosažených výsledků. Je však škoda, že se autorka nepokusila zajít dál a formulovat obecnější závěry o významu dosažených výsledků v kontextu současného stavu poznání a úrovně oboru. Po formální stránce je disertační práce zpracována velmi dobře, drobné poznámky k textu uvádím níže. Chválím i vysokou jazykovou úroveň práce. Obsahem příloh jsou autorčiny publikace a manuskripty včetně všech doplňujících dat. Vysoký počet publikačních výstupů nepochybně svědčí o autorčině péči i odborných schopnostech, na druhou stranu se domnívám, že mírná redukce počtu zařazených publikačních výstupů by práci prospěla a pomohla čtenáři pochopit, které výsledky považuje autorka za nejdůležitější. Uvítal bych také informaci o podílu autorky na jednotlivých publikacích a prosím v tomto smyslu o komentář.

Značná část dosažených výsledků již byla publikována v zahraničních časopisech s náročným recenzním řízením, což svědčí o jejich vysoké kvalitě v mezinárodním srovnání. Manuskripty prací odeslaných do tisku mají nepochybnou odbornou i formální úroveň a lze tedy předpokládat jejich přijetí a publikování. K disertační práci mám tyto komentáře a dotazy:

Komentáře:

1. Uvádět „CO<sub>2</sub>“ v seznamu zkratk není správné. Nejedná se o zkratku, ale o chemický vzorec.
2. Není zřejmé, k jakému typu prekurzorového iontu se vztahují hodnoty neutrálních ztrát v Table 1. Předpokládám, že např. v případě acylglycerolů jsou prekurzorovými ionty amonné adukty.
3. V textu postrádám odkazy na obrázky 5-7 a 11-13.

4. Na str. 26 ve větě na 12. řádku je použito slovo „degradation“. Považuji ho za nevhodné, spíše se jedná o „fragmentation“.

5. V doplňujících datech k publikaci č. 2 (Fig. S1) zcela chybí stránka s MS/MS spektry sloučenin 41-50.

6. V doplňujících datech k publikaci č. 6 zcela chybí Table S-1 a Table S-4.

7. Kvalita vazby doručeného výtisku disertační práce je špatná.

#### Dotazy:

1. V práci č. 2 věnované analýze oxylipinů je uvedeno, že v MS/MS spektrech všech látek byla pozorována ztráta CO<sub>2</sub>. Pro některé oxylipiny to však nemusí být pravda a neutrální ztráta 44 Da může odpovídat acetaldehydu, což je pravděpodobně případ látek strukturně příbuzných k PGF<sub>2</sub> a PGF<sub>1</sub>. Zajímalo by mě, zda bylo použito vysoké rozlišení pro potvrzení identity neutrálních ztrát u studovaných sloučenin. Jak velké je riziko nežádoucí oxidace lipidů při analýze oxylipinů a jaká opatření byla prováděna, aby se jí zamezilo?

2. V článku č. 3 byl optimalizován přídavek aditiv při extrakci lipidů. Jaké koncentrace aditiv byly v práci použity? Jak se mění účinnost extrakce lipidů s koncentrací aditiva? Nedochází při použití solí ke kontaminaci lipidové frakce a následně k tvorbě nežádoucích aduktů (např. u „shotgun“ lipidomiky)?

3. V článku č. 5 byla plasma centrifugována při 14 000 g aby se odstranily velké extracelulární vesikuly. K další analýze se vzalo 500 µl spodní vrstvy. Odebíral bych spíše vrchní vrstvu - nejedná se o chybu? Jak čistou frakci exosomů získáváte daným postupem? Přítomnost exosomů byla potvrzena mikroskopicky, není však zřejmé, zda vzorek obsahoval pouze exosomy, nebo i nějaký další materiál. Jak lze vysvětlit výraznější rozdíly v zastoupení lipidů při měření UHPSFC vs. UHPLC u exosomů než u plasmy?

4. Lipidomické analytické metody prezentované v disertační práci byly mimořádně pečlivě a důkladně optimalizovány. Zajímalo by mne názor autorky, zda lze tyto metody ještě dále zlepšit. Jaké výhody či nevýhody mají techniky založené na UHPSFC/MS či HILIC-UHPLC/MS v porovnání se „shotgun“ metodami? Jaká je budoucnost lipidomické analýzy z hlediska metodik?

Závěrem rád konstatuji, že předložená disertační práce Ing. Michaely Chocholouškové je souborem kvalitních vědeckých prací, které posunují lipidomickou analýzu po metodické stránce výrazně vpřed a přinášejí nové poznatky o analyzovaných lipidech a jejich koncentracích v biologických vzorcích. Výsledky byly publikovány formou několika článků v renomovaných odborných časopisech a prezentovány na řadě konferencí. Podle mého názoru Ing. Michaela Chocholoušková zcela jednoznačně prokázala připravenost k samostatné vědecké činnosti, a proto její disertační práci **doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 20. září 2020

doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Farmaceutická fakulta**  
**v Hradci Králové**

## **POSUDEK NA DOKTORSKOU DISERTAČNÍ PRÁCI**

**Název práce:** Quantitative lipidomics: High-throughput analysis of clinical samples of body fluids

**Kandidát:** Ing. Michaela Chocholoušková

**Oponent:** prof. PharmDr. Lucie Nováková Ph.D.

### **OBECNÁ CHARAKTERISTIKA:**

Předložená disertační práce si klade za cíl optimalizovat kvantitativní přístupy lipidomické analýzy s využitím metod hmotnostní spektrometrie. V rámci experimentů této disertační práce byly optimalizovány chromatografické metody ve spojení s hmotnostní spektrometrií, konkrétně RP-UHPLC/MS, HILIC-UHPLC/MS a UHPSFC/MS. Tyto metody byly zaměřeny jak na separaci tříd lipidů (monoacylglyceroly, diacylglyceroly, triacylglyceroly, cholesteryl-estery, ceramidy, sfingomyeliny, fosfatidylcholinu a lysofosfatidylcholinu) tak i na separaci jednotlivých lipidů ve skupině oxylipinů. Důraz byl kladen na správnou volbu vnitřních standardů, přístupů kontroly kvality, validaci metody a na získání správných výsledků měření klinických vzorků pacientů. Metody HILIC-UHPLC/MS a UHPSFC/MS použité pro separaci tříd lipidů byly porovnány a byly hodnoceny kritické aspekty práce s klinickými vzorky.

Disertační práce je sepsána jako komentovaný soubor prací, které prošly recenzním řízením a byly publikovány v odborných časopisech s impakt faktorem. Práce je zpracována na 57 stranách textu a doplněna přílohami publikovaných odborných článků na dalších úctyhodných 265 stranách. Dále je uveden seznam předložených výstupů a seznam použité literatury, který obsahuje 102 literárních odkazů. Po formální stránce předložená disertační práce splňuje požadavky kladené na tento typ kvalifikačních prací. Obsahuje všechny příslušné kapitoly včetně logického a přehledného začlenění jednotlivých příloh do komentářů. V teoretické části se autorka věnuje popisu metod lipidomické analýzy počínaje popisem extrakčních metod. Podrobněji se pak věnuje metodám chromatografickým a hmotnostně spektrometrickým. S nadhledem diskutuje rozdíly mezi jednotlivými přístupy a kriticky hodnotí jejich přínosy či limity. I přes některé nesrovnalosti ve vyjadřování v anglickém jazyce je tato část sepsána velmi zdařile. Navíc je doplněna přehlednými a graficky vydařenými ilustracemi, pravděpodobně

autorčiny vlastní tvorby. Komentáře k jednotlivým výstupům jsou stručné, ale výstižné. Vysokou kvalitu práce doktorandky pak dokladují články samotné.

Doktorandka ve své práci předkládá tři původní experimentální odborné články a jeden přehledový článek, které byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech (*Trends Anal. Chem.*, *Anal. Bioanal. Chem.* a *BBA-Mol. Cel. Biology*) a dále čtyři články, které jsou momentálně v recenzním řízení nebo těsně před vydáním (*Anal. Chim. Acta*, *Talanta* a *Nat. Commun.*). Na sedmi uvedených pracích má autorka významný podíl, na jedné částečný a u dvou z těchto prací je první autorkou. O vysoké kvalitě výstupů svědčí IF publikovaných prací, který se pohybuje v rozmezí 3,637 – 12,121, avšak u šesti výstupů z osmi převyšuje hodnotu 4,5! To je v kontextu úrovně prací tohoto typu opravdu nadstandardní. Autorka výsledky své experimentální práce prezentovala také formou plakátových sdělení, jak na tuzemských, tak na zahraničních konferencích.

Publikované práce Ing. Michaely Chocholouškové tak významně přispívají k rozvoji současného stavu poznání v oblasti lipidomiky, kde její školící pracoviště patří k nejlepším v oboru. Experimentální přístupy využívají metody inovativní nebo zcela odpovídající současným trendům v oblasti separačních věd a lipidomiky.

#### **K PRÁCI MÁM NÁSLEDUJÍCÍ DROBNÉ PŘIPOMÍNKY A KOMENTÁŘE:**

- Některé drobné překlepy: kapitola 1.2, str. 17: stage of disease are may of interest; kapitola 1.2.3.2.1, str. 23: hexan, heptan, kapitola 1.2.4: isotopic overlaps may influences, kapitola 1.2.4.4: are may affected, atp.
- Klíčová slova: kvalita kontroly nebo kontrola kvality?
- Zkratky: nesprávná definice SRM.
- V práci jsem nenašla vysvětlení zkratky LPE a CE.
- Číslování obrázků 9 a 10 a jejich odkazy v textu jsou pravděpodobně prohozené. U obrázků 11, 12 a 13 chybí odkazy v textu.

#### **DOTAZY A NÁMĚTY DO DISKUSE:**

- 1) Teoretická část 1.1, str. 15: Nerozumím zcela formulaci: „Detailed fatty acids linked to the glycerol backbone have to be experimentally proven....“ Prosím o vysvětlení.
- 2) V teoretické části je uvedeno, že v rámci chirálních separací lipidů jsou využívány stacionární fáze na bázi celulosy. Nejsou však uvedeny stacionární fáze na bázi amylosy. Existuje pro toto tvrzení nějaké vysvětlení? Je požadavek na chirální separaci enantiomerů lipidů v rámci lipidomického výzkumu běžný?
- 3) V kapitole 1.2.3.2.2 je uvedeno: „In order to pressurize the system a back-pressure regulator (BPR) after the column compartment is used in SFC.“ Je toto tvrzení správné?

- 4) V kapitole 1.2.4.2 je popsán NIST referenční standard plazmy, který byl připraven v roce 2007. Může autorka podrobněji vysvětlit, jak byl tento standard připraven, a jak je jeho referenční hodnota dlouhodobě zachována?
- 5) Na základě zkušeností získaných v rámci disertační práce, jaký je autorčin pohled na možnost klinické diagnostiky s využitím analýzy profilu lipidů, případně některých specifických lipidů?

#### **ZÁVĚR A DOPORUČENÍ:**

Předložená disertační práce „Quantitative lipidomics: High-throughput analysis of clinical samples of body fluids“ splňuje požadavky kladené na tento typ prací jak po formální, tak po odborné stránce. Přináší nové a hodnotné vědecké výsledky a potvrzuje schopnost autorky Ing. Michaely Chocholouškové samostatně vědecky pracovat, vyhodnotit získané výsledky a vyvodit příslušné závěry.

Práci proto **doporučuji k obhajobě a následně k udělení titulu doktor ve zkratce Ph.D.** dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....  
prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.  
Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

V Hradci Králové, 20. 09. 2020

Oponentský posudek disertační práce

**Ing. Michaely Chocholouškové**

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

### **Quantitative lipidomics: High-throughput analysis of clinical samples of body fluids**

Předložená disertační práce Ing. Chocholouškové je vypracována ve středně širokém pojetí a skládá se tedy z úvodu, přehledu cílů, výsledků a diskuze, závěru, přehledu literatury a příloh vlastních publikací. Práce se primárně zabývá metodikou stanovení analytů v biologickém materiálu (lidské plasmě/séru) a kvantifikací metabolitů na různých platformách.

Předkladatelka je první autorkou na jedné publikaci v *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, dále spoluautorkou na třech publikacích v *Trends in Analytical Chemistry*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* a *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*. Další autorské práce již nejsou součástí disertace.

Celá práce je psána anglicky, abstrakt pak v češtině. Úprava práce vyhovuje obecným formálním požadavkům kladeným na disertační práci, ale postrádám definování vlastního příspěvku Ing. Chocholouškové k jednotlivým publikacím.

#### Cíle

Hlavním cílem práce bylo dokázat, že dostupné metodiky je možné použít pro analýzu velkého množství biologického (klinického) materiálu a navrhnou pro tyto analýzy systém kontroly kvality a kvantifikaci přes lipidové třídy.

#### Teoretická část

Teoretická část je napsaná ve vhodném rozsahu, zabývá lipidy, chromatografií i hmotnostní spektrometrií v detailem respektujících finálně použitou hlavní metodiku (HILIC a SFC / shotgun a MRM). Zmíněna je také oblast kontroly kvality, kvantifikace pomocí (interních) standardů a statistické vyhodnocení dat. Velká část teoretického úvodu se překrývá (místy doslovně) s textem review Wolrab et al. (publikace 1), což není zcela ideální situace.

#### Výsledky a diskuze

Veškeré výsledky jsou shrnuty do 6 stran s tím, že details obsahují přiložené články. Zcela chybí zmiňovaná diskuze. Předložený text zhruba rekapituluje a popisuje výsledky, ale není připojena žádná vědecká diskuze. To považuji za nedostatek a například zhodnocení možných metodických přesahů na jiné matrice a nebo kritická diskuze nad použitými (interními) standardy (akceptovatelné rozdíly v retenčním čase, atd.) by byla na místě. V souvislosti s tím zcela postrádám kvantitativní i kvalitativní vyhodnocení příspěvku navrhovatelky k prezentovaným publikacím. Je potřeba definovat, jakým způsobem a jakou měrou se Ing. Chocholoušková podílela na jednotlivých publikacích hlavně ve vztahu ke studovanému oboru.

#### Otázky:

1. V publikaci 2 (oxylipins in human plasma) jste používala velké množství standardů, avšak v reálných vzorcích je počet identifikovaných/kvantifikovaných oxylipinů mnohem menší? Také jsou prezentována MS/MS spektra oxylipinů, která jsou běžně dostupná i pro vaši platformu na internetu. Jaký byl důvod tohoto postupu?
2. Výstupem publikace 2 je 6 analytů zvýšených u onkologických pacientek. Jelikož se jedná o běžné a majoritní analyty, které vznikají i neenzymaticky, nebylo by vhodnější použít scavenger typu BHT při přípravě vzorků? Pokud ne, pak z jakého důvodu?
3. V publikaci 3 (HILIC / SFC) neukazujete peak pro PA. Je PA třída, která se metodikou nedá stanovit?
4. V publikaci 3 používáte ESI+. Pokud vezmeme v úvahu reálnou koncentraci TAG v lidské plasmě, její rozpětí a velkou variabilitu v kompoziti TAGů, můžete diskutovat efekt iontové suprese na kvantitu této třídy? Lze podle vás měřit všechny zmiňované třídy z jednoho nástřiku?
5. V publikaci 4 zmiňujete (strana 11), že vypočítané koncentrace byly izotopicky opravené (Table S1 a S2). Jelikož jsem tabulky nenašel, můžete prosím vysvětlit důvod a postup korekce?
6. V textu několikrát zmiňujete použití „exogenních“ standardů typu LPA 17:0, PC 28:0 atd. Provedla jste analýzu, zda (a v jaké míře) jsou tuto sloučeniny přirozeně zastoupené ve vašich matricích? Jak byla optimalizována koncentrace těchto standardů vzhledem k biologické variabilitě koncentrací nativních molekul?
7. Domníváte se, že by bylo možné kvalitativní i kvantitativní složení vaší směsi standardů extrapolovat i na komplexnější matrice typu tkáňových biopsií?

**Závěr:**

Předložená práce řeší problém převodu „laboratorních“ analytických přístupů na úroveň validované práce s klinickými vzorky. Byla provedena stanovení několika tříd lipidů v lidském materiálu a rozpracovány koncepty pro kvantitativní analýzu potenciálních biomarkerů. Cíle práce byly splněny a zahrnuté publikace dokumentují, že se Ing. Chocholoušková spolupodílela na celé řadě analytických metod a výstupů. Ač mám výhrady k množství opravdu originálního vědeckého textu v disertační práci a chybějící definici reálného zapojení Ing. Chocholouškové do jednotlivých projektů, použité publikace byly již nezávisle recenzované v impaktovaných časopisech a jejich kvalita tedy hodnocena pozitivně.

**Disertační práci doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Praze 12. září 2020

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