



**ÚOCHB** <sup>AV</sup>/<sub>ČR</sub>  
**IOCB PRAGUE**

RNDr. Vladimír Vrkoslav Ph.D.

UOCHB AV ČR, v.v.i.

Hmotnostní spektrometrie

Flemingovo nám. 2

166 10 Praha 6

**Věc: Posudek oponenta disertační práce**

**Autor práce: Ing. Ondřej Peterka**

**Název práce: Lipidomická analýza spojením separačních technik s hmotnostní spektrometrií**

Disertační práce **Ing. Ondřeje Peterky** se zabývá vývojem nových metod pro kompletní charakterizaci lipidů v tělních tekutinách. Pro analýzu intaktních molekul polárních i neutrálních lipidů bylo současně využito kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi, hydrofilní interakční chromatografie a superkritické fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí. Těžiště této práce spočívá ve studiu retenčního chování lipidů, jejich identifikace a kvantitativní analýze. Dále byla studována derivatizační reakce různých tříd lipidů s benzoylchloridem, retenční chování získaných derivátů a jejich vlastnosti s ohledem na hmotnostní detekci. Autor se podílel také na vývoji softwarového nástroje pro vyhodnocení lipidomické analýzy a na statistickém vyhodnocení výsledků. Metoda UHPSFC/MS byla validována a aplikována při klinické studii lipidům různých druhů karcinomu.

Ing. Ondřej Peterka využil prací publikovaných v recenzovaných časopisech a doplnil je o teoretický úvod a experimentální část. Autor prezentuje v disertační práci dohromady 9 odborných článků (8 původních prací, 1 souhrnný článek) publikovaných ve velice kvalitních odborných impaktovaných časopisech (většinou Q1, s vysokým IF). U dvou z nich je Ing. Peterka uveden jako první autor a na ostatních se významnou měrou podílel. V úvodní části je krátce popsána teorie a jsou zde shrnuty poznatky související s experimentálními postupy. Následuje Experimentální část, kde přehledně shrnuje výsledky jednotlivých prací. Grafická úroveň práce vyhovuje standardům vyžadovaným u

disertačních prací. Jednotlivé části svým charakterem odpovídají požadavkům kladeným na disertační práce.

Je zřejmé, že se autor v oborech hmotnostní spektrometrie a lipidomiky dobře orientuje. Musel se během studia detailně seznámit s mnoha postupy a související instrumentací od přípravy vzorků přes různé separační techniky, hmotnostně spektrometrickou instrumentaci, interpretaci dat získaných pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie až po kvantifikaci a statistické vyhodnocení. Autor získal zajímavé výsledky.

Všechna zmíněná fakta hodnotím kladně. Odborné vědecké články prošly recenzním řízením a žádné výrazné nedostatky nemají. Zaznamenal jsem jen drobné chyby. Např. u článku č. 5., který je uvedený ve Vědeckém profilu autora, neodpovídá název a autoři publikace Příloze V. - *Analytica Chimica Acta*. 2020, 1137, 74-84. V některých případech bych uvítal podrobnější popis obrázků (např. popis fragmentovaného/studovaného iontu a neutrálních ztrát).

Výše zmíněné formální nedostatky mi nebrání disertační práci Ing. Peterky doporučit k obhajobě. Vzhledem k množství a kvalitě zahrnutých odborných publikací považuji disertační práci Ondřeje Peterky za výrazně nadprůměrnou doporučuji ji přijmout k obhajobě.

Dotazy k obhajobě:

1. Prosím o objasnění rozdílu v názvu publikace č. 5. (str. 50 a 75). Došlo během recenzního řízení ke změně názvu?
2. Byl použit nějaký softwarový nástroj pro identifikace lipidů v případě RP-HPLC analýzy (článek Příloha I.), nebo byla všechna spektra interpretována manuálně? V experimentální části článku není zmíněn žádný softwarový nástroj pro identifikaci lipidů.
3. Derivatizace benzoylchloridem poskytuje pro některé třídy lipidů složitou směs produktů. Někdy je složité se ve spektrech orientovat. Článek Přílohy II. Supporting Info. Fig-S4 - Třída LPC má jen jedno vazebné místo. Je popis a barevné označení jednotlivých aduktů správné?
4. Kalibrační křivky některých tříd lipidů po derivatizaci benzoylchloridem směřují výrazně mimo nulový bod (článek Příloha II. Supporting Info. Fig-S11.). Existuje vysvětlení? Jaké deriváty byly použity pro konstrukci kalibrační křivky v případě lipidů s více reaktivními místy a v případě PC, který s derivatizačním činidlem dle popisu nereaguje?

5. Do klinických studií byly zahrnuti zdraví jedinci a jedinci v různých stádiích rakoviny orgánů. Metabolismus tuků je ovlivněn i dalšími nemocemi a faktory, například diabetem, obezitou, záněty atd. Jediným kritériem pro výběr kontrolních jedinců do studie byla absence nádorového onemocnění. Mohou být jedinci, kteří mají ovlivněn metabolismus lipidů jinou nemocí, zpětně vyřazeni ze studie? Jsou data známa? Dotaz je motivován myšlenkou, že v klinické praxi by metoda byla pro dané jedince označena jako méně spolehlivá, ale mohla by se zvýšit její spolehlivost pro ostatní.

Datum vypracování posudku: **26.10. 2021**



Jméno a příjmení, podpis oponenta: **RNDr. Vladimír Vrkoslav Ph.D.**

Oponentský posudek disertační práce

**Ing. Ondřeje Peterky**

Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice

### **Lipidomická analýza spojením separačních technik s hmotnostní spektrometrií**

Předložená disertační práce Ing. Peterky je vypracována jako úvod a komentář k publikovaným článkům. Práce se primárně zabývá metodikou stanovení analytů v biologickém materiálu (lipidomikou), vývojem a srovnáváním metod (hlavně hydrofilní interakční chromatografie a superkritické fluidní chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií) a hledáním biomarkerů několika typů rakovin.

Ing. Peterka je prvním autorem či spoluautorem 8 publikovaných prací, jedné v recenzním řízení, řady posterů a dvou vlastních přednášek. Spoluorganizoval Školu hmotnostní spektrometrie a absolvoval zahraniční stáž v Německu.

#### Cíle

Hlavní cíle práce nejsou definovány. Lze je pouze odvodit z abstraktu a témat příložených prací. Domnívám se, že definování cílů by mělo být nedílnou součástí disertační práce.

#### Teoretická a experimentální část

Práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část, která je doplněna texty vlastních publikací. Ačkoli je práce psána česky, anglická verze abstraktu by si zasloužila mnohem více péče po slohové i gramatické stránce. Teoretická část obecného charakteru popisující lipidy by mohla být kratší a zacílená na téma. V předloženém stavu by mohla být použita prakticky na jakoukoli jinou disertaci. Biologické popisy u jednotlivých tříd lipidů jsou velmi zjednodušené (až matoucí) a na úrovni střední školy či Wikipedie. Pasáže v tomto duchu by bylo vhodnější z disertační práce zcela vynechat, neboť se nejedná o studovaný obor ani téma studia: strana 16 "Mastné kyseliny se také vyznačují vysokou reaktivitou vedoucí ke vzniku esterů (karnitiny) nebo amidů (N-acyl ethanolaminy)." nebo "Diacylglyceroly a monoacylglyceroly jsou významnými prekurzory v buněčném metabolismu, kdy působením enzymů probíhá fosforylace vedoucí ke vzniku glycerofosfolipidů." Teoretická část věnovaná analytické chemii je napsaná dle očekávání a na dobré vědecké úrovni. Jelikož je leitmotivem publikovaných článků hledání biomarkeru rakoviny, teoretická část by si zasloužila mnohem více rozpracovat sekci 1.1.4 o stávajícím rozsahu jedné strany.

V experimentální části jsou kapitoly 2.1. až 2.3. značně zmatečné. Není jasné, k čemu se text váže, nejsou zde odkazy na publikace, a ani na výsledky/grafy, které jsou popisovány. Celá tato sekce neodpovídá kvalitě publikovaných prací. Jelikož se jedná o prakticky jediné místo, kde má kandidát přesvědčivě ukázat vlastní tvůrčí schopnosti a vědecký přínos, je nutné se spolehnout hlavně na recenzní řízení v časopisech. Tento nedostatek částečně vyvažuje anglicky psaný autoreferát svou přehledností.

#### Výsledky a závěry

Veškeré výsledky jsou shrnuty na jedné straně s tím, že detaily obsahují příložené články. Zcela chybí diskuze či kritické zhodnocení výsledků.

Otázky:

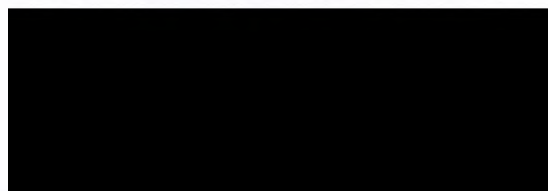
1. Strana 32 – 1.3.5 Kvantitativní analýza – jak si představujete praktické využití směsi <sup>13</sup>C značených interních standardů vyrobených z kvasinek (*Pichia pastoris*) vzhledem k určení absolutních koncentrací referenční směsi a distribuce koncentrací v různých biologických matricích?
2. V závěru je psáno „Budoucí plány směřují právě na minoritní lipidové třídy a kvantitativní analýzu jednotlivých izomerů, což by mohlo přinést další cenné poznatky spojené s vylepšením spolehlivosti predikce statistických modelů.“ Jakým způsobem by měla kvantitativní analýza vylepšit spolehlivost statistických modelů, když jsou data vstupující do těchto metod normalizována, a tedy absolutní hodnoty prakticky nepotřebné? Můžete uvést příklady?
3. Z jakého důvodu je databáze teoretických m/z hodnot v LipidQuant excelovém souboru uvedena pouze na 4 desetinná místa? Na základě čeho jste přiřadil například kvantifikaci CoQ10 k diacylglycerolům atd.?
4. Můžete prosím definovat Váš klíčový inovativní nápad v kontrastu se známými derivatizačními postupy v publikaci o použití benzoyl chloridu? Jakým způsobem jste korigoval kvantitativní informaci v případech, kdy sloučenina obsahovala několik reaktivních skupin, jednou až vícenásobně derivované sloučeniny, a rozdíly v jejich ionizaci či ochotě tvořit adukty?
5. V publikaci o exosomech není definován výpočet pro FDR. Vysvětlete, co v tomto případě znamená hodnota TRUE a jak byia získána. Dále nerozumím větě „Absolute molar concentrations are related to the volume of processed plasma, therefore molar concentrations in plasma are approximately 5 times higher, because plasma has other sources of lipids in addition to exosomes, which increases the overall molar concentrations in plasma.“ Vysvětlete prosím výpočet absolutních koncentrací v plasmě s exosomy a v izolovaných exosomech.

Závěr:

Předložené publikace z lipidomiky řeší aktuální problémy přenosu analytických metod do klinického prostředí. Jedná se tedy o téma progresivní a důležité, což dokládají identifikované biomarkery rakovin a standardizované analytické protokoly. Za kolekci 8 a 2 vědeckých článků publikovaných v impaktovaných časopisech zaostává vlastní zpracování disertační práce, která působí spíše jako katalogizovaný kompilát publikací opatřený zcela obecným úvodem. Pokud lze zhodnotit vědecký přínos publikací, na kterých se Ing. Peterka podílel, pak lze celkový výstup hodnotit kladně a **disertační práci doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 4. listopadu 2021

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





### Dotazy k diskuzi a připomínky

- 1) Název kapitoly 2.1 obsahuje slovní spojení lipidové druhy. Mohl byste prosím toto vysvětlit?
- 2) V současné době nám analytické nástroje umožňují provádět lipidomické profilování na úrovni identifikace acylových řetězců. Dalším logickým krokem by měla být identifikace pozice dvojnásobné vazby (tak jak je uvedeno v teoretické části). Uměl byste si představit techniku umožňující komplexní profilování na této úrovni identifikace?
- 3) Na straně 44 diskutujete geografické rozdíly v populačních lipidových profilech. Napadá Vás případně jiný důvod těchto rozdílů?

### Formální připomínky:

- 1) V některých případech je zbytečné používání pomlček ve slovech např. ultra-vysoká, pre-analytická apod.
- 2) V tabulce 2 je ne zcela jasné použití symbolů dvojtečky a lomítka u poměrů rozpouštědel.
- 3) Do tabulky 1 by bylo pro neinformovaného čtenáře pro lepší orientaci vhodné doplnit celé názvy jednotlivých lipidových tříd.
- 4) Slovo „softwary“ bych si dovolil ponechat v původním tvaru „software“, případně nahradit za „programy“.
- 5) Nepřesná formulace, např. na straně 40, dole: „Článek popisuje velké množství lipidů identifikovaných v lidské plazmě, přičemž...“

V Olomouci dne 3. listopadu 2021

  
doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.