

## **Analyza mastných kyselin u diabetických komplikací a jejich diagnostická aplikace**

Předložená disertační práce Ing. Marty Špryncové, studijního oboru Analytická chemie, školícího pracoviště Katedry biologických a biochemických věd FChT, Univerzity Pardubice shrnuje výsledky práce o stanovení vybraných mastných kyselin v plazmě pacientů s diabetes mellitus, metabolickým syndromem, jaterní steatózou a kardiovaskulárním onemocněním, jež jsou v disertační práci studovány a kriticky posouzeny.

### **I. Aktuálnost zvoleného tématu**

Téma dizertace bylo zvoleno dle společného výzkumu s Krajskou nemocnicí Pardubice o vlivu rizikových faktorů na složení mastných kyselin membrán erytrocytů a zánětlivé reakce po implantaci koronárního stentu u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Cílem tohoto výzkumu bylo stanovení obsahu mastných kyselin v membránách erytrocytů a ve fosfolipidech plazmy po perkutánní transluminární koronární angioplastice a vyhodnocení vztahu jednotlivých mastných kyselin k zánětlivé reakci. Dalším pracovištěm doktorandky byla během studijního pobytu Centrální laboratoř Interní kliniky IV, Fakultní nemocnice Univerzity Tübingen, Německo, kde stanovovala koncentrace mastných kyselin v lipidových frakcích vzorků plazmy pacientů s metabolickým syndromem, jaterní steatózou a diabetem mellitu. Aktuálnost zvoleného tématu se mi jeví proto nesporná.

### **II. Vytýčení cílů disertace**

Cíle disertace byly stanoveny ve studijním plánu doktorandky a lze je stručně formulovat jako analýzu složení mastných kyselin v plazmatických lipoproteinových frakcích onemocnění metabolického syndromu MS, jaterní steatózy JS, diabetes mellitus DM, kardiovaskulární choroby CVD a konečně kontrolní skupina zdravých lidí ZK a také jejich vzájemné porovnání a porovnání se zdravou kontrolní skupinou. Dalším cílem disertace bylo stanovení aktivit lipogenních enzymů, které jsou ovlivňovány inzulínovou rezistencí adipocytárních, jaterních a svalových buněk. Struktura disertační práce je v souladu s požadavky §6, vyhl. č. 64 Sbírky z 19. 9. 1977 a dále §47b zákona č. 111/1998 Sb., členění a potřebné separáty a celek respektuje předepsaná kritéria, a práce je i po formální stránce konzistentní.

### **III. Konkrétní dosažené výsledky a nové poznatky**

Za významné výsledky a užitečné poznatky dosažené v předložené disertační práci je třeba dle mého názoru považovat především následující naměřené, statisticky vyhodnocené a jasně prokázané závěry:

1. **Teoretická část** obsahuje kriticky zpracovanou literární informaci k meritu této studie.
2. **Experimentální část** popisuje pracovní postupy ke stanovení koncentrací mastných kyselin.
3. **Výsledky a jejich diskuse** obsahuje řadu výsledků a nových poznatků, ze kterých vybírám nejzávažnější:
  1. Pro celkové obsahy mastných kyselin v plazmě byly stanoveny koncentrační intervaly 40 mastných kyselin pro čtyři skupiny nemocných.
  2. Pokles koncentrace *cis*-palmitoolejové kyseliny o 23% u nemocných MS a o 51% u JS. Vysvětlením poklesu je inzulínová rezistence jater a tukové tkáně u JS.
  3. Koncentrace v jednotlivých frakcích byly kvantitativním analytickým hodnocením *cis*-palmitoolejové kyseliny jako lipokinu tukové tkáně, který realizuje přenos informace o její inzulínové rezistenci.
  4. U koncentrací mastných kyselin ve frakci fosfolipidů, diacylglycerolů a volných mastných kyselin byly nalezeny pouze nevýznamné rozdíly a koncentrační složení mastných kyselin v těchto frakcích nepřináší významné informace využitelné k diagnostickým účelům.
  5. Frakce triacylglycerolů je z diagnostického hlediska nejzajímavější a analýza mastných kyselin umožňuje diagnostické rozlišení skupin nemocných.
  6. Podle aktivitních indexů 9-desaturázy-C18 ve frakci TG lze rozdělit nemocné do jednotlivých skupin.
  7. K rozdělení nemocných MS, JS a DM do jednotlivých skupin nemocí je možné využít koncentrace mastných kyselin ve frakci, a to u DM jsou koncentrace 3,5 krát vyšší, než u ZK a 2,2 krát vyšší než u MS a 1,6 krát vyšší než u JS.
  8. K odlišení nemocných MS a JS lze využít koncentrace *cis*-palmitoolejové kyseliny, protože nalezené rozdíly jsou v této frakci nejvyšší a dostatečně průkazné.
  9. Byl nalezen významný rozdíl v koncentracích  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3 mastných kyselin, kde byl zjištěn růst koncentrace kyseliny linolové, arachidonové a zatelný růst celkové koncentrace všech  $\omega$ -6 mastných kyselin, při stejné koncentraci  $\omega$ -3 mastných kyselin oproti kontrolní skupině ZK.

Další diagnostické závěry vyžadují analýzu koncentrací dalších derivátů mastných kyselin vzniklých peroxidací, oxidací, cyklooxygenací a dalších enzymatických reakcí, které mohou ovlivňovat výsledně koncentrace mastných



kyselin. Jejich vliv se v současné době studuje ve stále větším rozsahu.

#### IV. Zhodnocení úrovně zpracování disertace

Po **obsahové stránce** má disertační práce dobrou úroveň, je psána přehledným způsobem a srozumitelným jazykem, neobsahuje nedoložená tvrzení a spekulace. Usnadňuje čtenáři možnost pochopení i dalších detailů, což zvláště u matematicko-statistického aparátu je cenné. I když pokrývá specializovaný obor biochemie, klinické a analytické chemie a vybraných partií z chemometrie, její odborné prezentaci bude biochemik a analytický chemik zcela jistě rozumět. Jako celek vyznívá dizertační práce velmi dobře. Jde o statistické zpracování biochemické a klinické problematiky reálných dat.

Následné dotazy jsou editačního charakteru a měly by podnítit diskusi při obhajobě. Ke kapitole **Výsledky a diskuse** mám následující komentáře:

**4.1 Kalibrační křivka** (Tab. 2) ukazuje na dostatečně přesně naměřené kalibrace, protože koeficienty determinace  $R^2$  dosahují vysokých hodnot, blízkých 1. V Tab. 2 je však  $R^2$  chybně označen za korelační koeficient. Uvádím, že  $100\% \cdot R^2$  se nazývá regresní rabat a vyjadřuje procento bodů přímky, které dokonale splňují přímkovou závislost.

**4.2.1 Přesnost metody** (Tab. 3) v parametru směrodatné odchylky SD dokazuje pečlivě a přesně provedený experiment. Bohužel hodnoty variačního koeficientu CV čili relativní směrodatné odchylky v procentech rovněž sice vedou k závěru velmi přesných dat, nejsou však autorkou komentovány, i když jsou CV u jednotlivých mastných kyselin značně rozdílné. Bylo by vhodné u obhajoby vysvětlit proč asi? Mez detekce je vynikající mírou k odlišení signálu od instrumentálního šumu a zde ukazuje na ještě statisticky významné koncentrace mastné kyseliny. Mez kvantifikace (dříve mez stanovitelnosti) je zde redundandní čili nadbytečně uváděná, i když některé lékařské časopisy ji stále ještě požadují.

**4.2.2 Opakovatelnost metody** (Tab. 5) rovněž prokazuje spolehlivé provedení kvantitativního stanovení. Čtenář si bohužel musí sám vysvětlit rozdíly v hodnotách meze opakovatelnosti LO u jednotlivých mastných kyselin. Zajímavé přitom je, že rozdíly mezi kyselinami jsou mnohdy značné. Co z toho vyplývá, bude předmětem diskuse při obhajobě.

**4.2.3 Reprodukovatelnost metody** (Tab. 7) dosahuje ještě v hodnotách meze reprodukovatelnosti ještě nižších hodnot než meze opakovatelnosti v Tab.5, což svědčí opět o velmi pečlivé laboratorní práci. V Tab. 7 je ale tento sloupec chybně nadepsán.

Po **formální stránce** jde o dobrou prezentaci. Doktorandka prokázala dostatečné zkušenosti při práci s počítačem. Lze proto konstatovat, že zde skvělá forma včetně kvalitní grafiky, obrázků jenom umocňuje obsah. K práci nemám formální připomínky.

U obhajoby je třeba předložit všechny kopie separátů k meritu disertace, které doktorandka cituje na konci disertace.

#### V. Význam pro rozvoj vědy a oboru

Předložená disertační práce má nesporný význam pro biochemickou a lékařskou praxi. Řeší užitečné praktické téma, užívá správně paletu instrumentálních metod a data jsou zpracována velice pečlivou statistickou analýzou. Ke statistickému zpracování dat nemám vážných připomínek, hodnotím přesvědčivý a rigorózní způsob zpracování naměřených dat. Práce je na dobré úrovni, statistické zpracování dat je pojato náročně a dosažené výsledky jsou proto přesvědčivé.


#### VI. Závěr oponentského posudku

Konstatuji, že předložená disertační práce plně vyhovuje požadavkům uvedeným v odst. 1, §2, vyhlášky č. 64/1977 Sbírky a dále §47b zákona č. 111/1998 Sb.. Disertační práce dokládá dostatečnou kvalifikaci doktorandky a představuje přínos pro rozvoj biochemicko-analytického oboru. To potvrzují i její výsledky publikované ve dvou odborných časopisech s IF.

**Disertační práci Ing. Martyiny Špryncové doporučuji k obhajobě.**

Na základě úspěšné obhajoby pak navrhuji udělení akademického titulu Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Pardubicích 15. března 2022

  
Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.  
Katedra analytické chemie  
Univerzita Pardubice, 532 10 Pardubice