



**Oponentský posudek na disertační práci Mgr. Lenky Laštovičkové
„Využití separačních technik pro screeningové vyšetření stavu metabolismu z vzorky suché
kapky krve“**

Předložená disertační práce Mgr. Lenky Laštovičkové je zaměřena na analýzu vybraných sloučenin ze suché kapky krve pomocí HPLC. Práce je koncipována klasicky – teoretická část, experimentální část, výsledky a diskuse. Podkladem pro její vytvoření jsou 2 články z impakt faktorem (IF = 3,935 a IF = 1,2) a jeden článek v univerzitním recenzovaném časopise. Mgr. Laštovičková je dvakrát první autorkou a jednou spoluautorkou.

Teoretická část, která má 30 stran, by se dala rozdělit na dvě části, první se zabývá suchou kapkou krve, přípravou vzorků z ní, stabilitou analytů v tomto typu vzorku. Druhou část tvoří metody stanovení vybraných analytů, tedy aminokyselin, vybraných ketokyselin a mastných kyselin, kterými se pak zabývá experimentální část práce. Největší prostor zde věnován derivatizačním činidlům pro jednotlivé analyty pro typ detekce, jež je používán pak v experimentální části (fluorescenční resp. plamenově-ionizační detekce), ale vzhledem k tomu, že jde o disertační práci očekávala bych komplexnější zpracování tématiky (např. separační podmínky HPLC resp. GC, lepší zpracování kapilární elektroforézy, další možné metody atd.). Dále se teoretická část zabývá asociací výše uvedených metabolitů s onemocněními a jejich referenčními hodnotami. Vzhledem k tomu, že jde o práci, která by měla mít dopad do oblasti klinické biochemie ev. patobiochemie myslím, že tato část by opět mohla být širší a lépe zpracovaná. I když se výše uvedené metabolity či jejich kombinace ev. profily prozatím v diagnostice nepoužívají existuje jistě více stavů, kde byly jejich změny popsány alespoň v rámci různých studií. Nejvíce je zde rozebrán diabetes mellitus, velká část je navíc tvořena jen základními informacemi o něm. Vzhledem k tomu, že v dnešní době je metabolomika včetně lipidomiky na vzestupu, existuje zcela jistě množství odborných materiálů zabývajících se změnami v různých metabolitech včetně mastných kyselin, které by se daly v této části využít. Chybí mi zde také zmínka o dědičných metabolických chorobách, kde jsou dobře popsány významné změny v koncentracích ketokyselin.

Experimentální část práce je poměrně podrobná, místy až nadměrně, kdy jsou uvedeny i konkrétní navážky chemikálií pro přípravu roztoků o dané koncentraci. Nabízí se pak otázka zda byly tedy tyto roztoky připraveny pouze jednou. Na druhou stranu některé důležité postupy chybí (viz připomínky). Vzhledem k tomu, že disertační práce má klasické členění a není pouhým souborem komentovaných publikací tak bych sekci výsledky a diskuse očekávala rozsáhlejší. Cílem práce bylo zavedení metodik pro stanovení uvedených metabolitů a jejich využití k vyšetření stavu metabolismu očekávala bych i výsledky týkající se optimalizace metod, aby bylo zřejmé, z jakých podmínek se vycházelo (např. publikace), které parametry byly optimalizované a jak tyto parametry ovlivňovaly analýzu (např. uvedení chromatogramů za různých podmínek, uvedení výtěžku extrakce za různých podmínek apod.). Například u stanovení AK se uvádí, že optimalizace metody LC-MS bude podrobně uvedena v disertační práci Mgr. Kopčily, že v této disertační práci je uvedena jen velmi stručně, ale v podobném rozsahu (pokud nepočítám derivatizaci, která je oproti LC-MS navíc) jsou uvedeny i výsledky u optimalizace HPLC-FLD. Tato metodika není součástí v publikacích, jež jsou podkladem disertační práce, tudíž by si zasloužila obsáhlejší popis. Vzhledem k tomu, že výsledné chromatogramy zavedených metod jsou důležité, bylo by vhodné jim obecně vhodně věnovat dostatečný (větší) prostor. U stanovení AK jsou také prezentovány pouze chromatogramy směsných standardů a nikoliv reálných vzorků. Zavedené metodiky byly pak použity pro analýzu vzorků krve získaných metodou suché kapky od 60 dobrovolníků. V závěru výsledkové části práce obsahuje statistické zpracování získaných výsledků a sleduje také vztahy mezi jednotlivými analyty.

*
=
..
^
~



Práce obsahuje kolem 190 referencí, převážně publikací s impakt faktorem. Pouze malá část z nich jsou nejnovější práce z posledních 5 let. Dle mého názoru by jejich větší zastoupení mohlo přispět k vyšší kvalitě disertační práce. Co se týká formálního zpracování práce, je zde řada nedostatků (viz připomínky) a práce působí trochu zmatečně. To je zřejmě způsobeno i určitým odstupem studentky od samotného doktorského studia a tematiky, protože v posledních letech je spoluautorkou publikací na jinou tematiku na jiném pracovišti.

Připomínky k disertační práci:

- Ačkoliv práce obsahuje seznam zkratk, ty nejsou v textu správně zaváděny při prvním použití (např. DBS, NS, BCAA, PUFA), tabulka 2 obsahuje zkratky ketokyselin bez vysvětlení atp. To vede ke snížení přehlednosti.
- V sekci chemikálie jsou podkapitoly aminokyseliny, ketokyseliny a mastné kyseliny, ale uvedené chemikálie nepatří pouze do těchto skupin. Správně by mělo být chemikálie pro stanovení aminokyselin atd.
- Nechápu uvádění koncentrací roztoků v experimentální části ve formě „asi“ např. asi 1 mmol/l NaOH, asi 5,5 mmol OPA, asi 9,4% NaCl (str. 54-56) včetně přípravy standardů, které rozhodně nemohou mít asi nějakou koncentraci např. asi 10 mmol/l jednotlivých AK (str. 57)
- V experimentální části zcela chybí popis stanovení AK pomocí fluorescenční metody, a to jak příprava vzorků derivatizací, tak podmínky separace. Je uvedeno pouze stanovení LC-MS bez derivatizace
- Zápis koncentrace se uvádí s mezerou za číslem tedy 1 mmol/l či 5 mmol/l, což je v celé práci uvedeno chybně
- Prezentace tabulek je v řadě případů značně snižuje přehlednost práce. Tabulky by měly být celé na jedné stránce a nikoliv mít např. jeden řádek na předchozí stránce (např. tab. 8, tab. 14), příliš velké tabulky je třeba upravit tak, aby se vešly (např. rozdělit typy derivatizačních činidel dle finální detekce u tab. 1, tab. 3) nebo přesunout do příloh. Některé tabulky navíc nemají popis (např. přípravy standardů v experimentální části)
- Bylo by vhodné uvést seznam publikací studentky nejen tezí disertační práce, ale také v disertační práci samotné, alespoň těch publikací, z kterých disertační práce vychází

Dotazy k disertační práci:

- 1) Jaké je riziko kontaminace vzorků krve odebraných metodou suché kapky? Například při schnutí kapky nebo skladování vzorků?
- 2) Byla ve studii sledována stabilita jednotlivých metabolitů? V kapitole 1.1.4 je uvedeno, že například stabilita ketokyselin v DBS není dostatečně zmapovaná a mastné kyseliny jsou relativně stabilní. Jsou nějaké novější informace z této oblasti ať už vaše nebo z publikací.
- 3) V kapitole 1.1.6 uvádíte, že extrakce analytů je třeba dělat off-line bez zapojení do systému a jsou jako reference uvedeny články z roku 2010-2013. Nebyl v této oblasti udělán za cca 10 let nějaký pokrok? Bez automatizace tohoto kroku dle mého názoru není možné uvažovat a masivnějším rozšíření tohoto typu vzorku
- 4) DBS se v praxi používá v novorozeneckém screeningu. Jaké sloučeniny a jakými metodami se stanovují v ČR a jaká onemocnění je možné tímto screeningem diagnostikovat?
- 5) Můžete uvést podrobnější výsledky týkající se optimalizace vybrané metodiky, např. HPLC-FLD AK. Jak se lišili jednotlivé extrakční metody? Jak byla optimalizována separace atd.
- 6) Jaký vnitřní standard byl použit pro analýzu AK? Jakým způsobem byl do vzorků přidáván?
- 7) Ve výsledcích (příloze) chybí analytické parametry pro stanovení KK metodou HPLC-FLD. Naproti tomu jsou uvedeny parametry pro LC-MS stanovení, které není v disertační práci vůbec





- vedeno. Navíc se tyto hodnoty neshodují ani s hodnotami v publikaci Kandar et. al. 2022, která je podkladem pro disertační práci. Vysvětlete a případně uveďte hodnoty
- 8) Diskutujte hodnoty LOD, LOQ pro vybrané metabolity ve vztahu k zamýšlenému použití. Jsou dostatečné zejména u analytů, které mohou být vlivem např. onemocnění sniženy.
 - 9) Okomentujte význam stanovených vztahů mezi analyty. Může mít nějaký popsáný statistický významný vztah reálné využití?
 - 10) Jaké je zamýšlené použití zavedených metodik? U jakých pacientů/patologických stavů se plánuje monitorovat hladiny uvedených metabolitů? Zhodnoťte také možnosti využití DBS v analýze vzorků. Myslíte, že se v budoucnu v praxi skutečně masivněji rozšíří? Co by tomu mohlo napomoci?

I přes řadu nedostatků, které výše zmiňuji, Mgr. Lenka Laštovičková prokázala ve své disertační práci a publikacích, jejichž je autorkou či spoluautorkou schopnosti samostatné vědecké práce. Splňuje také požadavky příslušné směrnice FChT UPCE tudíž tuto disertační práci doporučuji k obhajobě a také jako podklad pro udělení titulu Ph.D. ve smyslu příslušných právních norem

V Hradci Králové 9.6.2022

.....
doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

