Posudek vedoucího diplomové práce

Katedra: Katedra analytické chemie

Autor: Bc. Jan Vlach

Název práce: Stanovení kyselých glykosfingolipidů v lidské plazmě pomocí hmotnostní spektrometrie

Vedoucího diplomové práce: Ing. Robert Jirásko, Ph.D.

Kyselé glykosfingolipidy (aGSL) mají v lidském organismu mnoho důležitých funkcí. V poslední době se prokázalo, že jejich koncentrace v krvi je v důsledku různých onemocnění (např. rakoviny) pozměněna, což naznačuje jejich potenciál pro včasnou detekci těchto onemocnění na základě analýzy krevní plazmy. Bohužel v krvi je jejich koncentrace v porovnání s dalšími lipidy velmi nízká.

V rámci diplomové práce byl úkol vylepšit dosavadní extrakci a přípravu vzorku s cílem zvýšit počet kvantifikovaných aGSL, konkrétně gangliosidů a sulfatidů, v lidské plazmě. Student přistupoval k plnění zadaných úkolů odpovědně a pracoval samostatně. Diplomová práce odpovídá zadání, formální požadavky jsou dodrženy a jazyková úroveň textu i grafické zpracování jsou na průměrné úrovni.

Teoretická část se nejprve věnuje základnímu popisu studovaných lipidů, jejich metabolismu a biologickým funkcím v lidském organismu. Dále jsou diskutovány jednotlivé ionizační techniky, hmotnostní analyzátory a metody přípravy vzorku, které se využívají při jejich lipidomické analýze. V experimentální části jsou přehledně shrnuty použité chemikálie, instrumentace a postupy přípravy vzorku, vlastní analýzy a validace metody.

V části „Výsledky a diskuze“ popisuje optimalizaci přípravy vzorku. Práce byla především postavená na vybrání vhodného objemu plazmy, extrakčního protokolu a další přípravy vzorku před vlastní MALDI-MS analýzou za účelem kvantifikace co největšího počtu aGSL. Extrakční protokoly byly zkoušeny tři: dvojitá Folch extrakce, SPE-C18 a SPE-WAX. Poslední protokol byl vyřazen už při optimalizaci, protože nevedl k reprodukovatelným výsledkům. Jelikož se nepodařilo vyvinout selektivní extrakci založenou na iontové výměně, tak autor využil existující extrakční protokoly, které upravil s ohledem na množství extrahované plazmy a zakoncentrování. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro 100 µl plazmy s 10x zakoncentrováním. Tento postup vedl k identifikaci 59 zástupců aGSL v lidské plazmě pro Folch extrakci a 65 zástupců aGSL pro SPE-C18 extrakci. Tyto informace bohužel chybí v závěru diplomové práce, kde autor shrnuje pouze výsledky z následné validace a měření referenčního materiálu NIST plazmy a závěr tak působí neúplně.

Dále bylo nutné ověřit, zdali pozměněné extrakce aGSL fungují správně a jsou reprodukovatelné na různých koncentračních hladinách, a zdali při analýze nenastane problém s interferencemi řádově vyšších fosfolipidů. Validace metody prokázala, že oba postupy extrakcí jsou kompatibilní s MALDI-MS analýzou, a že obě metody jsou vhodné pro semikvantitativní lipidomickou analýzu studovaných sloučenin, což prokázalo i srovnání výsledků proměřených extraktů NIST plazmy s literaturou.

Ačkoliv lze v diplomové práci nalézt méně přehledné pasáže, nejednotnost číslování referencí, řadu překlepů a pravopisné chyby, autor naplnil vytyčený cíl a v porovnání s literaturou dokázal kvantifikovat více než dvojnásobek aGSL. Zoptimalizované metody jsou tedy připravené na reálné využití pro měření klinických vzorků, při kterém se ukáže, zdali zvýšený počet kvantifikovaných gangliosidů a sulfatidů povede k lepším výsledkům s ohledem na správnost detekce rakoviny na základě specifického lipidového profilu v krevní plazmě.

Vzhledem k výše uvedenému práci doporučuji k ústní obhajobě a navrhuji stupeň hodnocení

A

V Pardubicích, 20. května 2022

Ing. Robert Jirásko, Ph.D.