



Oponentský posudek na disertační práci

RNDr. Tomáše PLUHÁČKA

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM V METABOLOMICE A FORENZNÍ ANALÝZE

Aktuálnost zvoleného tématu

Disertační práce řeší dvě společensky i výzkumně aktuální témata. První z nich spadá do oblasti medicíny, druhé do oboru kriminalistiky. Společným jmenovatelem obou zaměření je použitá analytická technika – hmotnostní spektrometrie v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS). Laserová ablace ve spojení s atomizací a ionizací v indukčně vázaném plazmatu a detekcí iontů hmotnostní spektrometrií (LA-ICP-MS) představuje efektivní nástroj pro zobrazování rozložení prvků v biologických vzorcích. Prvkové mapy mohou být dobrým vodítkem pro zjišťování plošné a objemové distribuce důležitých biomakromolekul s navázanými atomy kovů nebo metaloidů. Této vlastnosti autor disertace využil při zobrazování invazivní plicní aspergilózy a k vypracování metodiky spolehlivého ztotožnění prvkových a molekulárních map identických řezů pomocí prostorových značek. Roztoková analýza ICP-MS se uplatnila při stanovení obsahu železa a mědi v myokardu v souvislosti s chronickým selháním srdce. I druhé téma může souviset se zdravotním stavem (obětí). Analýzou povýstřelových zplodin na ruku střelce lze po sejmutí otisku rekonstruovat daktyloskopický důkaz. Z prvkového složení lze usuzovat na použití zbraně.

Řešená témata jsou vysoce aktuální a odpovídají požadavkům na disertační práci v doktorském studijním programu Analytická chemie.

Zvolené metody zpracování

Disertační práce obsahuje čtyři vytyčené cíle: *i)* aplikace multimodálního přístupu (PET/CT, LA-ICP-MS, SEM-EDS, histologie) pro studium invazivní plicní aspergilózy; *ii)* vývoj a optimalizace vhodného složení prostorových značek pro spolehlivý překryv molekulárních a prvkových map; *iii)* studium povýstřelových zplodin; *iv)* vývoj a validace ICP-MS metody pro stanovení Fe a Cu v biologických tkáních.

RNDr. Pluháček si pro řešení témat zaměřených na zobrazování struktury a složení biologických materiálů osvojil zobrazovací metody hmotnostní spektrometrie a efektivně je aplikoval. Při studiu invazivní plicní aspergilózy využíval kromě pozitronové emisní tomografie a LA-ICP-MS také histologického barvení a rastrovací elektronové mikroskopie se zobrazením pomocí detekce zpětně odražených elektronů a s měřením sekundární emise Roentgenova záření v uspořádání s energiově disperzní detekcí pro mapování prvků. Histologické barvení založené na selektivní redukci stříbra mu umožnilo mapovat postižené oblasti plicních řezů také metodou laserové ablace s hmotnostní spektrometrií v indukčně vázaném plazmatu a potvrdit tak prostorové rozložení izotopů železa vázaného v mikrobiálních sideroforech na základě shody s distribucí vyredukovaného stříbra a při tónování chloridem zlatitým také zlata. LA-ICP-MS distribuce železa byla kvantifikována s pomocí kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí, v nichž byl obsah železa stanoven po mikrovlnném rozkladu části standardu roztokovou analýzou s ICP-MS. Pro měřicí metody vypracoval RNDr. Pluháček postupy přípravy vzorků, jako jsou rozklad a zhotovení tenkých řezů. Optimalizoval kolizní celu hmotnostního spektrometru s ICP zdrojem pro minimalizaci spektrálních interferencí se současným zachováním potřebných mezí detekce železa.

Pro účely multimodálního zobrazování metodami hmotnostní spektrometrie s desorpční elektrosprejovou ionizací, laserovou desorcí a ionizací za účasti matrice, laserovou ablací



s ionizací v indukčně vázaném plazmatu, a dále optickou a fluorescenční mikroskopií navrhl, připravil a otestoval prostorové značky pro ztotožnění jednotlivých 2-D a 3-D distribucí významných molekul a prvků v řezech připravených z myší ledviny.

Pro studium povýstřelových zplodin RNDr. Pluháček odebíral vzorky otisků prstů střelce s přístupem analytického chemika, a tedy minimalizoval riziko kontaminace a vysoké hodnoty slepého pokusu. Otisk byl pořízen pro mapování rozložení prvků LA-ICP-MS a dále pro stanovení celkového obsahu ICP-MS. Paralelní otisky byly odebrány pro vizualizaci a výpočet plochy otisku pomocí daktyloskopické pásky. Byly použity pro identifikaci střelce na základě porovnání prvkových map.

Studium vztahu mezi obsahem železa a mědi v myokardu a funkcí srdečních mitochondrií v kontextu srdečního selhání vyžadovalo optimalizaci mikrovlnného rozkladu a pracovních podmínek ICP-MS a dále validaci metody.

Disertační práce má jedenáct kapitol. Po úvodní kapitole následují dvě kapitoly věnované metodice ICP-MS včetně rozkladu biologických vzorků a zobrazovací hmotnostní spektrometrii LA-ICP-MS. Ve čtvrté kapitole jsou formulovány cíle práce. Další čtyři kapitoly jsou věnovány čtyřem cílům práce a dvě následující kapitoly tvoří seznam literatury a seznam zkratk. Jedenáctou kapitolu představují výtisky čtyř publikací, které se vztahují k cílům i), ii) a vi), tj. k multimodálnímu zobrazování, prostorovým značkám a dále ke stanovení železa a mědi v souvislosti se srdečním selháním. Každá ze čtyř kapitol věnovaných jednotlivým cílům je členěna podle struktury časopisecké publikace, což usnadňuje orientaci čtenáře. Disertační spis je zpracován po věcné, gramatické i grafické stránce velmi kvalitně, bez chyb a překlepů, s výjimkou str. 37, kde je chyba ve vztahu (3) a str. 42, kde v poslední větě chybí sloveso.

Zvolené metody zpracování jsou adekvátní studované problematice a odpovídají požadavkům na disertační práci v doktorském studijním programu Analytická chemie.

Dosažené výsledky, nové poznatky a přínos k dalšímu rozvoji vědy

Disertační práce RNDr. Tomáše Pluháčka přináší nové poznatky do analytické chemie, konkrétně do oblasti zobrazovací hmotnostní spektrometrie. Těžiště spočívá ve vytvoření originálních metodik pro: i) multimodální zobrazování pomocí selektivního značení biologicky/patologicky významných analytů vybranými kovy, které umožňuje citlivé mapování pomocí LA-ICP-MS; a dále ii) zajištění správného a přesného překryvu molekulárních a prvkových map na základě nově vyvinutých prostorových značek. Precizně vypracované aplikace pro iii) forenzní studie a pro vi) výzkum vztahu mezi srdečním selháním, funkcí srdečních mitochondrií a obsahem prvků jsou založeny na optimalizaci jednotlivých fází analytického postupu, validaci metod s použitím referenčních materiálů a průkazném statistickém vyhodnocení.

Na základě dosažených výsledků považuji obsah disertační práce za velmi podstatný přínos k dalšímu rozvoji vědního oboru Analytická chemie.

Otázka

V souvislosti s použitím mnoha principiálně odlišných zobrazovacích technik v tématech i) a ii) mne zajímá, zda jste s těmito metodami osobně pracoval nebo zda jste měření koordinoval a pak dával do souvislosti data z těchto metod s vašimi měřeními s LA-ICP-MS?

Závěr

Disertační práce RNDr. Tomáše Pluháčka splňuje požadavky kladené na tento typ závěrečné práce, a proto doporučuji, aby po úspěšné obhajobě byl Mgr. Pluháčkovi udělen titul Philosophiae Doctor (Ph.D.) ve studijním programu Analytická chemie.

V Brně 17. 10. 2017

prof. RNDr. Viktor Kanický, DrSc.



RNDr. Tomáš Pluháček

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v metabolomice a forenzní analýze

RNDr. Tomáš Pluháček se ve své disertační práci zabývá aplikacemi hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v klinické a forenzní analýze. Jeho práce ukazuje nové a zajímavé možnosti využití této vysoce citlivé analytické techniky, a to jak v podobě klasické analýzy z roztoku, tak zejména varianty založené laserové ablaci vzorku. Metoda LA-ICP-MS je využita pro hmotnostně spektrometrické zobrazování s důrazem na použití v multimodálních zobrazovacích systémech. Téma práce je vysoce aktuální a relevantní k současnému biomedicínskému výzkumu a moderní kriminalistice.

Po odborné i jazykové stránce je disertační práce RNDr. Tomáše Pluháčka velmi kvalitní. Práce má 96 stran, obsahuje kopie 4 publikací a životopis autora, cituje 162 odborných prací. Úvodní kapitoly představují základní principy a technická řešení techniky ICP-MS, přičemž je podrobně diskutována problematika interferencí. Pozornost je věnována technikám rozkladu vzorku. Následuje část o zobrazovací hmotnostní spektrometrii, principech a praktických aspektech LA-ICP MS včetně postupů kvantitativní analýzy. Velmi pečlivě a čtivě zpracovaná úvodní část nenechává čtenáře na pochybách o širokém přehledu uchazeče v daném oboru. V disertační práci dále následují čtyři kapitoly zabývající se jednotlivými projekty. Každá z těchto kapitol má vlastní úvod, experimentální část, výsledkovou část a závěr. Jsou věnovány multimodálnímu zobrazování plicní aspergilózy, prostorovým značkám pro multimodální zobrazování, analýze povýstřelových zplodin na otiscích prstů a studiu obsahu železa a mědi v myokardu. Následuje seznam citované literatury a seznam použitých zkratk. Všechny výsledky jsou náležitě diskutovány v jednotlivých kapitolách, přesto bych v práci uvítal shrnující kapitolu, která by diskutovala práci jako celek, shrnula její hlavní výsledky v kontextu současného poznání a vytýčila další směry výzkumu. Přestože je práce po formální stránce velmi pečlivě zpracovaná, některé drobné chyby se v práci vyskytly. Jejich seznam je v příloze tohoto posudku. Drobné nedostatky však nesnižují celkově vysokou odbornou úroveň disertační práce.

Většina dosažených výsledků byla publikována v zahraničních odborných časopisech a tak již úspěšně prošla nezávislým oponentním řízením. Data uvedená v disertační práci jsou dostatečně komentována, čímž autor poskytuje jen velmi málo prostoru k otázkám. Přesto mám několik dotazů:

1. Pro sledování invazivní plicní aspergilózy byla s úspěchem využita LA-ICP-MS, přičemž byl sledován signál železa vázaného na siderofory, a dále signál stříbra či zlata specificky vázaných na buněčnou stěnu houby. Chtěl bych se zeptat, jak jsou takové výsledky specifické pro aspergilózu, tj. zda existují i jiná houbová onemocnění, která by poskytla stejný výsledek distribuce těchto kovů? Jinými slovy, byla by MSI analýza dostatečným diagnostickým důkazem aspergilózy?
2. Prosím o komentář vzorce pro výpočet poměru signálu k šumu (SNR) na str. 37. V tomto vztahu vystupuje kromě intenzity signálu a intenzity pozadí také koncentrace analytu v matričním standardu. Proč tomu tak je? V jiných analytických technikách je SNR dáno prostým poměrem intenzity signálu k intenzitě šumu.

3. Jaká byla velikost prostorové značky pozorovaná na řezech ledviny? Byla v okolí značky narušena distribuce analytů? Pokud jsem správně pochopil, připravená směs byla do vzorku aplikována pomocí injekční stříkačky ručně. Je možné aplikaci značky provádět nějakým automatizovaným způsobem?
4. Velmi zajímavé výsledky byly získány analýzou povýstřelových zplodin na otiscích prstů. Za jak dlouho dobu po „výstřelu“ je možné v otiscích prstů detegovat zplodiny? V jaké chemické formě jsou studované prvky přítomny?
5. V kapitole zabývající se chronickým srdečním selháním je diskutována role železa. V následujících experimentech se autor vedle železa zaměřil i na obsahy mědi. Jaká je biologická role mědi v srdečním svalu? Bylo by přínosné využít zobrazovací hmotnostní spektrometrii pro studium distribuce železa a mědi v srdeční tkáni?

Závěrem rád konstatuji, že předložená disertační práce RNDr. Tomáše Pluháčka je kvalitním vědeckým počinem přinášejícím řadu nových poznatků zejména v oblasti LA ICP-MS a zobrazovací hmotnostní spektrometrie. Výsledky byly publikovány formou několika článků v renomovaných odborných časopisech a prezentovány na řadě konferencí. RNDr. Tomáš Pluháček je prvním autorem dvou článků týkajících se tématu disertační práce. Podle mého názoru uchazeč dostatečně prokázal připravenost k samostatné vědecké činnosti, a proto jeho disertační práci **doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 8. října 2017


.....
doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Seznam drobných nedostatků a chyb

Str. 1. Bývá zvykem vysvětlit použité zkratky při prvním použití. Na str. 1 jsou uvedeny zkratky PET/CT, SEM-EDS bez vysvětlení.

Str. 5. Použití jednotky amu není správné. Tato jednotka byla odvozena od izotopu kyslíku ^{16}O a byla používána před zavedením unifikované atomové hmotnostní jednotky u (Da) v roce 1961 ($1 \text{ u} = 1 \text{ Da} = 1,000\,32 \text{ amu}$).

Str. 6. Vysokou koncentrací solí je zřejmě míněno $> 2000 \text{ mg.l}^{-1}$.

Str. 32. Název barviva eosinu se nepíše s velkým počátečním písmenem.

Str. 33. V kapitole o přípravě kalibračních roztoků je uvedeno, že pro minimalizaci vlivu ředění nesmí celkový objem přídatku roztoku železa překročit $20 \mu\text{l}$. Tato informace je však nedostatečná, neboť není uvedeno k jakému objemu homogenizované tkáně je roztok železa přidáván. Rovněž není zřejmé, jak byl maximální přípustný objem roztoku železa stanoven.

Str. 42. Ve druhé větě chybí sloveso.

Kapitola 6. U iontových obrázků chybí specifikace rozměrů zobrazované tkáně.

Str. 74. Na čtvrtém řádku je překlep („identifikaci“, má být „identifikace“).



RECENZNÍ POSUDEK NA DISERTAČNÍ PRÁCI

Název práce: Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v metabolomice a forenzní analýze

Autor: RNDr. Tomáš Pluháček

Oponent: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Předložená disertační práce se zabývá možnostmi využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ve spojení s laserovou ablací pro účely prvkové analýzy v klinických a forenzních oborech. Použitá technika je velmi citlivá a umožňuje zobrazování distribuce prvků s velmi dobrým rozlišením na objektech s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Těchto vlastností se autorovi podařilo velmi efektivně využít.

Práce má klasické členění na úvod, teoretické kapitoly zabývající se popisem hmotnostní spektrometrie, technikami zobrazování hmotnostní spektrometrií a metodami práce s biologickými vzorky, cíle práce, čtyři samostatné kapitoly zaměřené na problematiku, kterým se autor experimentálně věnoval (každá ve vlastním strukturovaném členění), seznam použité literatury, seznam zkratk a přílohy. Přílohy obsahují i reprinty čtyř impaktovaných publikací s přímým vztahem k tématu disertační práce, z nichž u tří je RNDr. Pluháček prvním autorem. Výsledky uvedené v jeho disertační práci tedy úspěšně prošly kritickým recenzním řízením, což svědčí o jejich kvalitě.

K práci mám několik připomínek a otázek uvedených v pořadí, jak vznikaly v průběhu čtení práce.

Z pohledu českého jazyka jsou poněkud zvláštní termíny „**energiově** disperzní spektrometr“ a „**energiově** filtrovaná transmisní elektronová mikroskopie“, které jsou v práci často používány. Jde dle názoru autora již o ustálené pojmy nebo je možno výstižně nazvat tyto techniky česky i jinak?

Věta na str. 35: „Jelikož by v případě popsaného potkaního modelu experimentální aspergilózy imunodeficientní jedinci nepřežili více než 5 až 6 dnů od intratracheální aplikace spor *A. fumigatus*, proto byli potkani usmrceni již třetí den.“ není gramaticky úplně správná. Slovo „**proto**“ je ve větě nadbytečné. Z praktického úhlu pohledu by mě zajímalo přesnější vysvětlení, na základě jakých kritérií se v těchto případech rozhoduje o nejvhodnější době usmrcení potkanů od aplikace spor. Jde o hodnocení rozsahu invaze plísně nebo k rozhodnutí přispívají i jiné okolnosti?

Ve větě na str. 37: „Tedy v případě LA-ICP-MS zobrazování biologicky relevantních pomocí hmotnostních spektrometrů....“ Chybí jedno slovo. Patrně jsou na mysli materiály nebo objekty nebo podobně.

Na obrázku 5.5 jsou uvedeny výsledky LA-ICP-MS zobrazování IPA infekce. Prosím o přesnější vysvětlení, čím se liší obrázky napravo od obrázků nalevo.

Prosím o vysvětlení věty na str. 53: „V této fázi byly pořízeny optické obrazy jednotlivých tkání pomocí skeneru HP Scanjet s rozlišením 1200 dpi (DESI) a 4800 dpi (MALDI, LA-ICP-MS).“ Z věty mi není zcela jasné, na co poukazují zkratky technik v závorkách. Jde o informaci o rozlišení optického obrazu odpovídající těmto technikám nebo o něco jiného? Zde mohla být informace podrobnější.

Za velmi užitečné a efektivní považuji použití prostorových značek pro překrytí obrazů získaných různými technikami. Umožňuje použitý postup (a software) i „natažení“ nebo „kompresi“ obrazu v případě, že dojde ke změnám v rozměrech analyzovaného řezu v průběhu jejich přípravy k analýze různými zobrazovacími technikami?

Otázka do diskuse k LA-ICP-MS analýze povýstřelových zplodin. Jaký způsobem byste připravil certifikovaný referenční materiál pro případnou kvantifikaci kovů z povýstřelových zplodin v oblastech papilárních čar?

Prosím o podrobnější komentář k obrázku 7.6. Dle popisku jde u 7.6.D o fúzování referenčního otisku s 2D distribucí olova u dvojčete 1. Vizuálně ale vliv referenčního otisku na tomto obrázku není patrný (obrázek D vypadá, snad s výjimkou krátkého náběhu papilárních čar z referenčního otisku na levé hraně, identicky s obrázkem C).

Práce je velmi kvalitní po stránce faktické, jazykové i grafické. Text obsahuje jen velmi málo překlepů a drobných gramatických prohřešků, což svědčí o pečlivém zpracování a kontrolním čtení díla před tiskem. Těch málo příkladů, kterých jsem si v průběhu čtení práce všimnul, připojuji níže:

Str. 3, kap. 2, ř. 8, „multielementárního“ - má být „multielementární“

Str. 7, ř. 15, „...je velmi podobná s hodnotou m/z“ - má být: „...je velmi podobná hodnotě m/z“

Str. 40, popisek k Obr. 5.5, „...data byly nasbírány..“ – správně je: „...data byla nasbírána..“

Str. 74, ř. 4, „...na principu daktyloskopické identifikaci zahrnující...“ - má být: „identifikace“.

Uvedené připomínky jsou minoritní povahy a v žádném případě nesnižují vysokou - a mohu říci nadstandardní - úroveň práce. Jde o aktuální a novátorské dílo obsahující řadu výsledků s vysokým potenciálem využití ve vědeckých oblastech i v řadě oborů klinické a forenzní praxe. Mohu konstatovat, že disertační práce jednoznačně splnila vytčené cíle.

Předloženou disertační práci rád **doporučuji k obhajobě** a v případě jejího úspěšného průběhu navrhuji udělit RNDr. Tomáši Pluháčkovi akademický titul „**philosophiae doctor**“ (ze zkratce „**Ph.D.**“).

V Olomouci, 29. září 2017

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Katedra analytické chemie, PřF

Univerzita Palackého v Olomouci

E_mail: petr.bednar@upol.cz