



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Děkanát, Hněvotínská 3, 779 00 Olomouc

V Olomouci 20.července 2017

Zápis o konání obhajoby disertační práce v oboru Lékařská genetika

Mgr. Lukáš Najdekr, vědecký pracovník Ústavu lékařské genetiky LF UP a FNOL, studentka prezenční formy doktorského studijního programu *Lékařská genetika* na LF UP v Olomouci.

Téma práce: „**Metabolomics tools in Diagnosis of inborn errors of metabolism**“

Obhajoba se konala v Olomouci dne 20. července 2017 v 11:00 hod.

Komise:

předseda: prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D. ✓

místopředseda: doc. RNDr. Radek Vrtěl, Ph.D. ✓

členové: prof. MUDr. Jiří Šantavý, CSc. ✓

doc. MUDr. Alena Šantavá, CSc. ✓

MUDr. Renata Gaillyová, Ph.D. ✓

doc. Mgr. Radek Vodička, Ph.D. ✓

Oponenti:

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D. ✓

Katedra analytické chemie PŘF UP v Olomouci

RNDr. Petr Šimek, CSc. *Orellman*

Biologické centrum AV ČR, v.v.i. v Českých Budějovicích

Školitel: prof. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D. ✓

Předseda komise přednesl stručnou charakteristiku uchazeče, hodnocení školitele a vedoucího školicího pracoviště. Poté uchazeč vyložil podstatný obsah své disertace. Oponenti přednesli své posudky. Uchazeč odpovídal na připomínky a dotazy oponentů.

Ve vědecké rozpravě vystoupili: viz příloha – zápis o diskusi.

Hlasování se účastnilo ...*6*... členů komise. Kladně hlasovalo ...*6*... členů, záporně ...*0*... členů, neplatných lístků bylo odevzdáno ...*0*....

Usnesení:

Přítomní členové komise tajným hlasováním rozhodli, že **Mgr. Lukáš Najdekr** obhájil disertační práci a doporučili udělení akademického titulu doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

.....
prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D.
předseda komise

Zápis z obhajoby Mgr. Lukáše Najdekra ze dne 20.7.2017

Otázky a odpovědi - prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

- str. 15 - Jak souvisí selektivita s izotopově značenými standardy?

Selektivita se zde více vztahuje na MRM přechody popisované výše v kapitole.

- Str. 20 - Jak lze kvantifikovat neznámé metabolity na základě spektrálních dat?

Zde jsem použil tabulku z originální publikace a souhlasím, že je tato formulace poněkud nešťastná. Nicméně autoři chtěli nejspíše zdůraznit jejich diferenciaci na základě spektrálních dat, nežli jejich kvantifikaci.

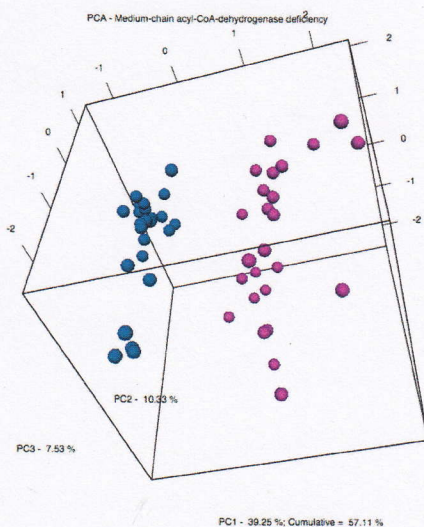
Sumner, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* **3**, 211–221 (2007).

- Str. 33 - V jakém významu používá autor pojem "isobars"?

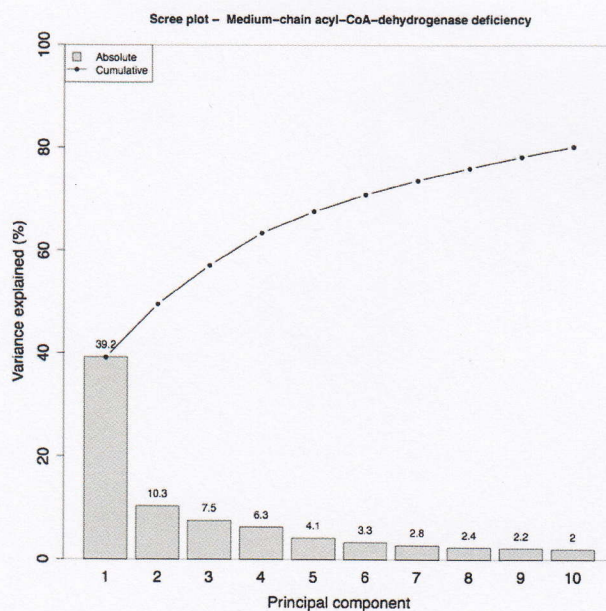
Zde je podobná analogie jako u prvků - izobary mají stejné nukleonové číslo, ale rozdílné protonové číslo. Rozumíme tím tedy látky se stejnou hmotou, ale jiným sumárním vzorcem.

- Str. 36 - Zlepšilo by se odlišení vzorků při zobrazení pro 3 hlavní komponenty?

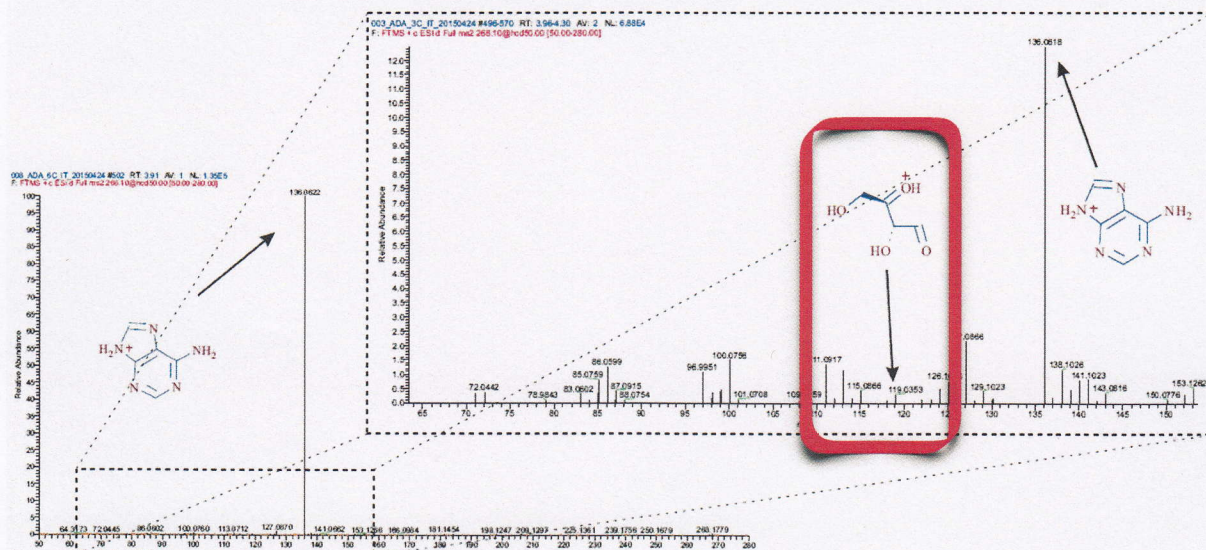
Ano, ale v našem případě jen málo významně (7.5%). Pro lepší přehlednost byly ponechány pouze 2



komponenty.



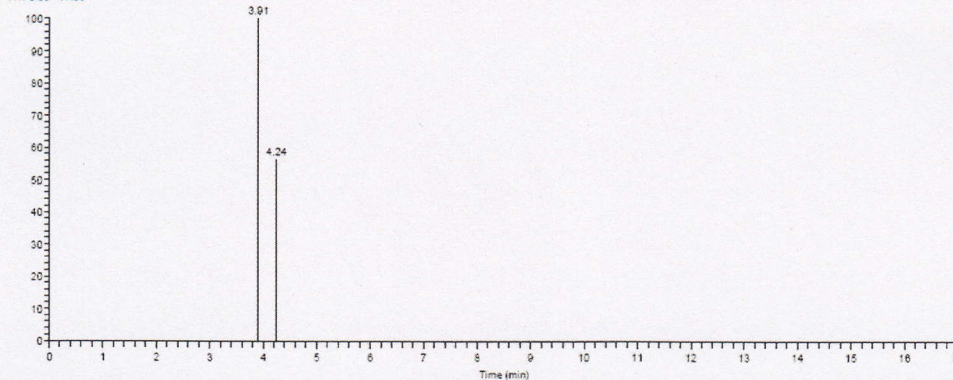
- Str. 56 - Lze považovat signál ve spektru na obr.31 při m/z 119,0353 za průkazný?



003_ADA_6C_FT_20150424 #496-570 RT: 3.96-4.30 AV: 2 NL: 6.88E4

4/24/2015 1:22:19 PM

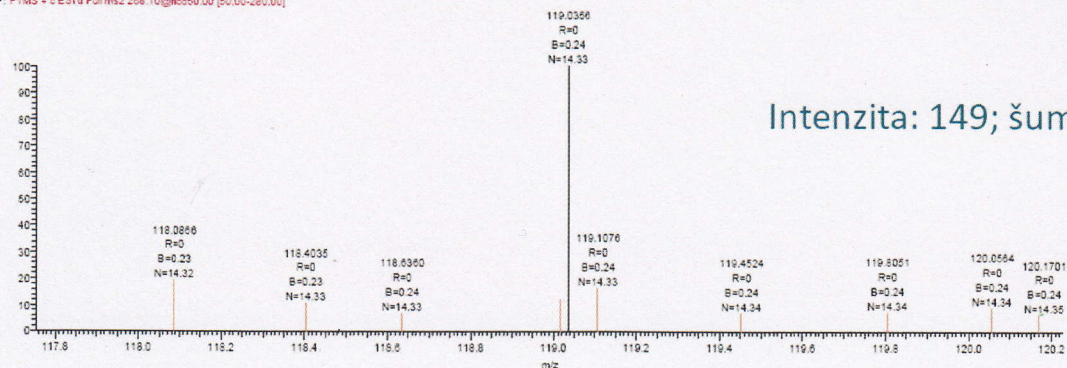
RT: 0.00 - 17.00



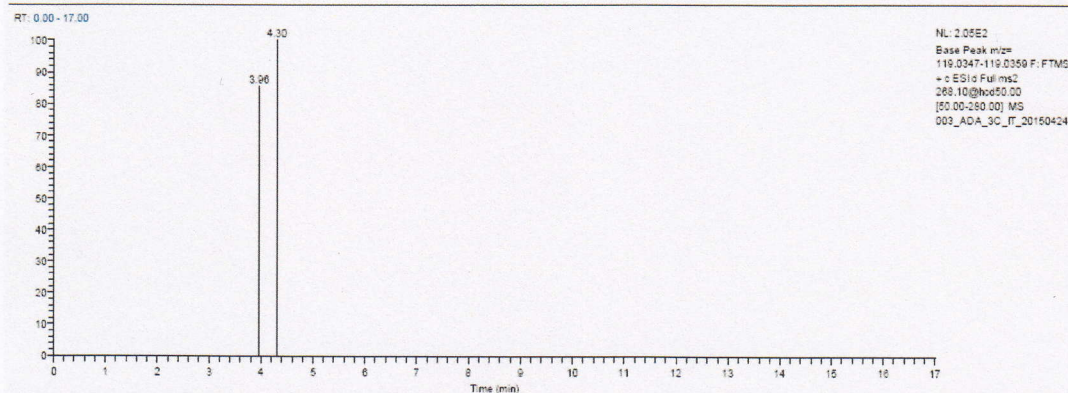
NL: 2.88E2
 m/z: 119.0347-119.0359 F:
 FTMS - c ESI/d Full ms2
 268.10@hcd50.00
 [50.00-260.00] MS
 008_ADA_6C_FT_20150424
 4

008_ADA_6C_FT_20150424 #475-616 RT: 3.91-4.59 AV: 3 NL: 1.48E2

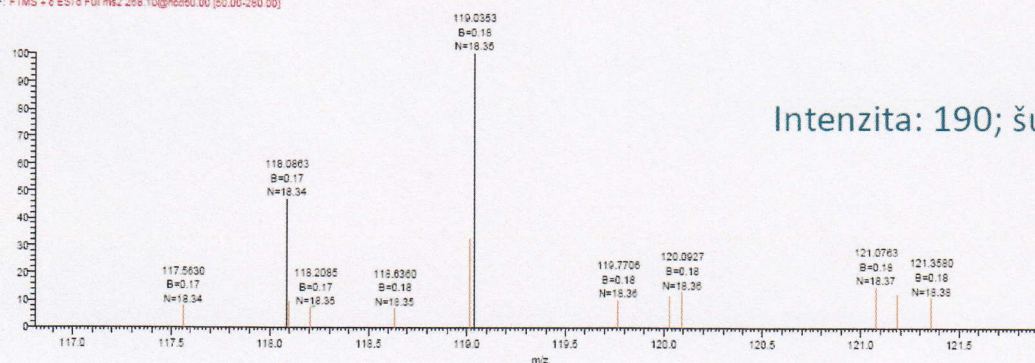
F: FTMS - c ESI/d Full ms2 268.10@hcd50.00 [50.00-260.00]



Intenzita: 149; šum: 14,33



003_ADA_3C_FT_20150424 #490-682 RT: 3.96-4.30 AV: 2 NL: 1.90E2
F: FTMS + c ESI's Full ms2 288.10@h0e50.00 [50.00-280.00]



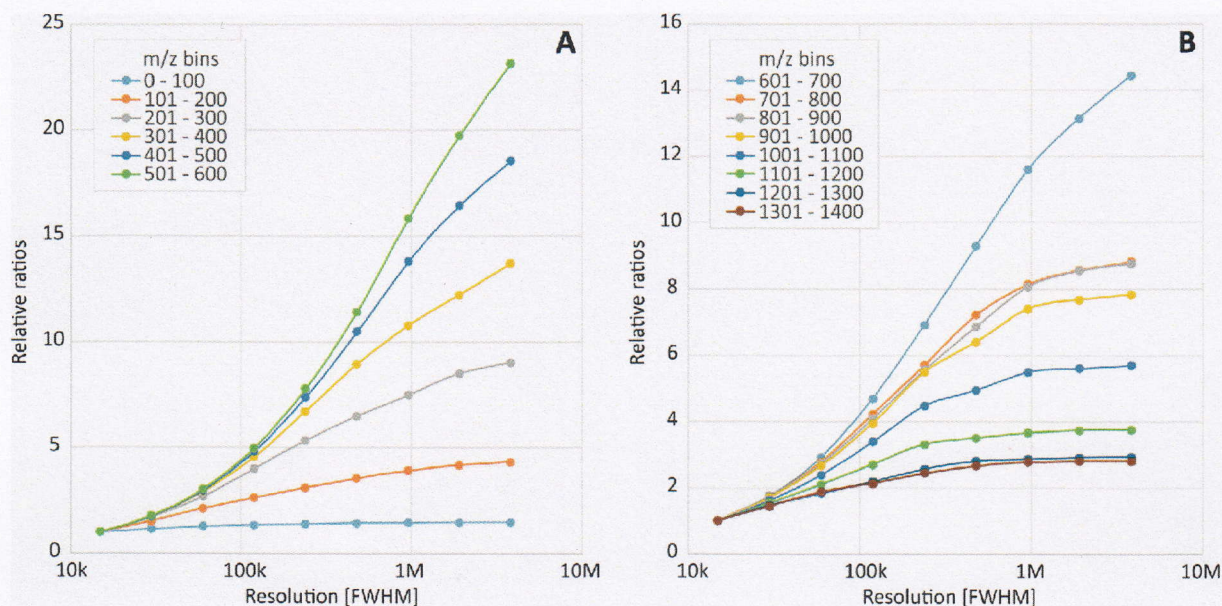
- Na straně 10 autor uvádí výskyt onemocnění v různých evropských zemích. Je známa příčina rozdílů mezi zeměmi, např.: mezi Řeckem (1:16000) a jižní Evropou bez Řecka (1:300000)?

U některých populací je výskyt defektního genu nižší než u jiných a pokud nedochází k vysoké migraci mohou vznikat takto vysoké rozdíly v incidenci onemocnění. V tomto případě se zdá také, že data jsou ovlivněna zavedením novorozeneckého screeningu.

- Autor identifikoval nové potenciální biomarkery. Jaké by byly další kroky k jejich zavedení do klinické praxe?

Průkaznost jejich specifity a sensitivity na větší kohortě vzorků (právě probíhá), po té validace dané analytické metody za použití interního standardu pro jejich měření. Momentálně provádíme kvantifikaci přibližně 50 tis vzorků.

- Může autor shrnout příčiny změny trendu (viz. obr. 47 A,B)?



Příčinou může být vyšší výskyt isomerů lipidů, které nelze oddělit pomocí rozlišení.

- Na straně 74 dole autor správně uvádí, že lepší výsledky by poskytl hmotnostní spektrometr s rychlejším skenem. Je takový k dispozici?

Ano, technologický vyspělejší model je již na trhu - Orbitrap Fusion Lumos - využívá modernější verzi orbitální pasti.

- V řadě obrázků jsou uváděny struktury iontů. Co bylo oporou pro návrhy konkrétních struktur?

Struktury byly generovány pomocí softwaru Mass Frontier jehož fragmentační mechanismy jsou založeny na publikovaných datech. Samozřejmě jednotlivé fragmenty mají spousty mezomerních struktur a bez kvantově-chemických výpočtů nelze přesně určit jejich energeticky nejvýhodnější konformaci.

Otázky a odpovědi - RNDr. Petr Šimek, Csc.

- Str. 17, vynález elektrospreje je zřejmě dřívějšího data, viz práce "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme, Yamashita M, Fenn JB, *J. Phys. Chem.*, **1984**, 88(20), pp 4451-4459.

Ano, máte pravdu, měl jsem použít dříve publikovaný článek. Publikace, kterou jsem v práci uvedl, s odstupem hodnotí dopad ESI na analýzu biomolekul a byla publikována v časopise *Science*.

- Str. 40, Tab. 3 a Tab.1 v Talantě: může přiřazené elementární složení $[M+H]^+$ iontů 623.5091 a 639.4089 odpovídat skutečnosti? Pomohla by interpretace spekter oxidovaných fosfolipidů metoda spektrálních stromů?

Sumární vzorce $C_{30}H_{74}O_9NP$ - 623.5091; $C_{38}H_{58}O_5NP$ - 639.4089 jsou podobné dalším oxidovaným fosfolipidům např.: $C_{33}H_{65}O_{10}NP$ - PC(16:0;9:0(COOH)) - PAzPC. Lze tedy předpokládat jejich správnost, nicméně bez dodatečných měření to potvrdit nelze. Spektrální stromy by pomohly, pokud by se nám podařilo získat dostatečnou koncentraci analytu např.: pomocí frakčního kolektoru a následným zakoncentrováním. Pokud se jedná o otázku dusíkového pravidla, kdy lichý počet dusíků v molekule se vyznačuje lichou molekulovou hmotností, tak toto pravidlo je velice nespolehlivé (> 20 % nejistoty) pokud se jedná o přesnou hmotu s hodnotou vyšší než 500 Da.

Kind, T. & Fiehn, O. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* **8**, 105 (2007).

- Str. 54, Obr. 28 odpovídá zcela spektrálnímu stromu 2-deoxyadenosinu na Obr.32, nikoli tedy samotnému adenosinu. Bylo by možné porovnat spektrální stromy všech čtyř zkoumaných metabolitů? Jaký publikační výstup bude realizován k tomuto tématu?

Spektrální stromy jsou tvořeny systematickým uspořádáním jednotlivých fragmentačních spekter. Vzhledem k vysoké strukturní podobnosti těchto metabolitů lze tedy očekávat i vysoce podobné struktury spektrálních stromů. V tomto případě došlo bohužel k záměně obrázků spektrálního stromu 2-deoxyadenosinu a adenosinu (Obrázky 28 a 32 jsou identické).

Toto krátké téma bude nejspíše realizováno jako "Short communication" nebo bude přidruženo k podobnému, většímu celku pro kompletní publikaci. Ve spolupráci s univerzitou v Nijmegenu jsou již připravovány další choroby. Nové metabolity jsou podobné analogy a mohly by přispět pro zlepšení screeningu, ale u nás není ADA zahrnuta v NBS. Bylo by potřeba provést podobnou studii jako u MCADD - tedy cílenou metabolomickou analýzu.

Veřejná diskuse:

Prof. MUDr. Martin Procházka, Ph.D.: „V současné době se provádí analýza kolika chorob v novorozeneckém screeningu?“

Odpověď: U nás laboratoři se provádí měření 13 chorob a celkem se měří 18.

RNDr. Petr Šimek, CSc.: „V publikaci jste srovnávali tři softwary. Každá firma má jiný software a vytěží jiné množství dat. Jaká je Vaše zkušenost s vytěžováním dat obecně?“

Odpověď: Dle mého názoru je lepší jít cestou „open-source“ software, protože Vám umožní srovnání dat mezi laboratořemi. Z těchto tří softwarů, uvedených v publikaci, je dle mého názoru nejlepší MZmine, protože Vám umožňuje náhled jednotlivých kroků procesingu. Na rozdíl např. od XCMS, kde máte vizualizaci pouze finálního kroku.

MUDr. Renata Gaillyová, Ph.D.: „Je možné v rámci rozšíření screeningu MCADD snížit falešnou negativitu a zkoumali jste propojení genetických mutací a diagnostiku pomocí nových biomarkerů?“

Odpověď: V podstatě je to smysl této práce. Tím, že akumulace těchto klasických metabolitů (oktanoyl karnitin, dekanoyl karnitin) způsobuje oxidační stres jsou tvořeny sekundárně tyto oxidované lipidy (PAzPC, PGPC). Měli by být nezávislé na stravě, a proto by měly být vhodné pro dlouhodobé sledování pacientů trpících MCADD. V publikaci jsme také zkoumali korelaci těchto metabolitů a vyšlo nám, že nekorelují, což dokazuje jejich vzájemnou nezávislost.

MUDr. Renata Gaillyová, Ph.D.: „Biologickou analýzu DNA jste neprováděli?“

Odpověď: Data byla dostupná, jelikož byly vzorky použity z novorozeneckého screeningu, ale zatím jsme je nezkoumali podrobněji. Zatím nedovedeme přesně stanovit jejich koncentraci, v publikaci byla použita semikvantifikace. Až bude hotová analýza většího souboru pacientů, který zrovna probíhá, tak se tím budeme zabývat více do hloubky.