

Oponentský posudek disertační práce

Název: Metabolomic tools in diagnosis of inborn errors of metabolism

Autor: Mgr. Lukáš Najdekr

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

Konzultant: doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

Oponent: prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Disertační práce sepsaná panem Mgr. Lukášem Najdekrem v anglickém jazyce je zaměřena na problematiku analýzy metabolitů v lidském organismu. Analytickým nástrojem je hmotnostní spektrometrie především ve spojení s kapalinovou chromatografií. Konkrétněji se jedná o řešení zajímavých otázek souvisejících s diagnostikou vrozených metabolických poruch.

Disertační práce je předložena ve formě textu o rozsahu 97 stran včetně seznamu zkratk, seznamu literatury a přehledu autorových publikací a prezentací na konferencích. V přehledu jsou uvedeny čtyři práce publikované v časopisech s impaktním faktorem, které souvisejí s výzkumem popisovaným v disertační práci. Dvě z nich se neobjevují v seznamu literatury, i když například přehledový článek úzce souvisí s teoretickou částí. Pro čtenáře by bylo příjemné, pokud by autor připojil všechny čtyři publikace jako přílohy tištěné verze disertační práce.

V teoretické části Mgr. Lukáš Najdekr seznamuje čtenáře v přiměřeném rozsahu s problematikou dědičných metabolických poruch, podrobněji se věnuje poruchám spojeným s deficitem acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCAD) a adenosindeaminasy (ADA). Následně pojednává o metabolomice a soustředí se na uplatnění hmotnostní spektrometrie v této oblasti. Teoretická část je zpracována přehledně a poskytuje potřebné informace před představením vlastních výsledků. Při jejím zpracování se autor opíral o 57 literárních pramenů, v celé disertační práci využil 93 pramenů. Rozsah rešerše lze považovat za postačující.

V disertační práci jsou s náležitými detaily uvedeny experimentální postupy zahrnující přípravu vzorků, hmotnostně spektrometrické měření i zpracování dat. Následně jsou prezentovány a diskutovány výsledky vlastní badatelské činnosti. Nalezeny byly potenciální biomarkery oxidativního stresu u pacientů trpících deficitem MCAD, pozornost byla věnována hmotnostně spektrometrickým postupům identifikace malých organických molekul a vlivu rozlišovací schopnosti hmotnostního spektrometru na detekci metabolitů. Podstatné

části disertační práce již byly publikovány, a to v uznávaných analytických časopisech - Talanta a Analytical Chemistry. V obou případech jde o práce velmi kvalitní a Mgr. L. Najdekr je u nich prvním autorem, což podtrhuje jeho příspěvek k řešené problematice. Z pohledu analytické chemie je velmi přínosná především publikace v prestižním časopise Analytical Chemistry, která má bezpochyby obecnější význam pro metabolomické studie. Závěrem doktorand shrnuje podstatné výstupy disertační práce.

Je zřejmé, že část výsledků uvedených v disertační práci prošla náročným recenzním řízením. Lze konstatovat, že mají význam pro rozvoj poznání v oblasti badatelského zájmu autora. Mgr. L. Najdekr měl ujasněnou koncepci práce, zvolená metodika je na patřičné vědecké úrovni a odpovídá dnes moderním přístupům.

K předkládané práci mám následující připomínky a dotazy či náměty do diskuze:

- K formálním připomínkám patří komentáře k terminologii, oprava překlepů či jazykových prohrěšků, např. str. 22 – „...can highly increase...“ nikoli „can highly increasing“; str. 24 – „in human, is“ – nemá být čárka; str. 25 – lépe „study of spectral trees“; str. 27 – věta „The stationary phase...“ měla být formulována jinak; str. 31 – „a respective spectral trees“ - nevhodně uveden neurčitý člen; str. 45 – „lipids which contains“ má být „lipids which contain“; str. 56 – překlepy „x33“, „x34“ apod.; str. 65 – mělo by být „variability of“, překlep „400 m/z 600 and m/z“; str. 77 – popis obrázku 55 se jeví jako neúplný;
- Str. 15 – pro upřesnění - kolizní celou nemusí být kvadrupól (viz zmínka o druhém kvadrupólu). Str. 17 – termín „electron impact“ není doporučován v současné nomenklatuře. Spojení termínu „precise measurement“ s kvadrupólem resp. trojitým kvadrupólem by vyžadovalo podrobnější komentář. Str. 19 – „hydrophobic“ má být „hydrophilic“. Str. 23 – termín „molecular ion“ není vhodně použit. Termín „ion trap“ zde může být zavádějící, byť orbitální past je také „iontová past“. Str. 46, 49, 50 – v popisu obrázků (Fig. 17, 23, 25) neodpovídá pořadí grafů.
- Str. 15 – jak souvisí selektivita s izotopově značenými standardy?
- Str. 20 – jak lze kvantifikovat neznámé metabolity na základě spektrálních dat (str. 20)?
Předpokládám, že myšleno hmotnostně spektrometrických dat?
- Str. 33 – v jakém významu autor používá pojem „isobars“?
- Str. 36 – zlepšilo by se odlišení vzorků při zobrazení pro tři hlavní komponenty?
- Str. 56 – lze považovat signál ve spektru na obr. 31 při m/z 119,0353 za průkazný?

- 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)?
- Autor identifikoval nové potenciální biomarkery. Jaké by byly další kroky vedoucí k jejich zavedení do klinické praxe?
- Může autor shrnout příčiny změny trendu (viz obr. 47A,B)?
- Na straně 74 dole autor správně uvádí, že lepší výsledky by poskytl hmotnostní spektrometr s rychlejším skenem. Je takový k dispozici?
- V řadě obrázků jsou uváděny struktury iontů. Co bylo oporou pro návrhy konkrétních struktur?

Závěrem rád konstatuji, že disertační práce obsahuje zajímavé výsledky, autor je náležitě zpracoval a diskutoval v kontextu dnešního poznání. Uvedené připomínky jsou formálního rázu nebo nabízejí okruhy k rozpravě během obhajoby, nikterak nesnižují význam práce. Kvalitu předložených výsledků dokládá jejich publikování v uznávaných časopisech. Stanovené cíle práce byly splněny a dosažené výsledky jsou cenné v mezinárodním srovnání a významné pro rozvoj studovaného oboru.

Doktorand prokázal své tvůrčí schopnosti, potřebné teoretické znalosti a experimentální dovednosti. Předložená práce splňuje obvyklé požadavky kladené na disertační práce. Vzhledem k výše uvedenému doporučuji předloženou disertační práci k obhajobě a na základě úspěšné obhajoby udělit Mgr. L. Najdekrovi akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Olomouci 13. 4. 2017

prof. RNDr. Karel Lemr, Ph.D.

Přírodovědecká fakulta UP v Olomouci



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

adresa: Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice
telefon: +420 387 771 111 (ústředna)
+420 387 775 051 (ředitelství)

IČ: 60077344 | DIČ: CZ60077344
číslo účtu: 6063942/0800, Česká spořitelna, a.s.
www.bc.cas.cz | e-mail: bc@bc.cas.cz

Oponentský posudek doktorské dizertační práce

Název: **Metabolomics Tools in Diagnosis of Inborn Errors of Metabolism**

Autor: **Mgr. Lukáš Najdekr**

Studijní program: Lékařská genetika

Školitel: Prof. RNDr. Tomáš Adam, Ph.D.

Konzultant: Doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

Datum podání: Olomouc, 7. března 2017

Předkládaná dizertační práce byla vypracována v Laboratoři dědičných metabolických poruch a v Laboratoři metabolomiky Lékařské fakulty Univerzity Palackého a byla zaměřena na výzkum, vývoj a zdokonalení metabolomických analytických metod pro aplikace v klinické diagnostice dědičných metabolických poruch. Mgr. Lukáš Najdekr (dále autor) se ve své práci zaměřil zejména na tři dílčí témata:

- (1) Výzkum deficitu acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCADD) pomocí nástrojů necílené metabolické analýzy,
- (2) Zkoumání spektrálních stromů jako nového nástroje identifikace klíčových metabolitů u pacientů s deficitem adenosin deaminázy (DAD),
- (3) Studium vlivu rozlišení hmotnostního spektrometru typu orbitální iontová past na rozsah pokrytí detekovaných metabolitů v krevní plasmě.

Předložené výsledky a publikační činnost ve dvou špičkových mezinárodních vědeckých časopisech představují významný příspěvek autora k rozvoji oborů metabolismu dědičných poruch a metabolomiky. Pro výzkum uvedených témat byla zvolena původní řešení, použité metody výzkumu splňují nejnáročnější kritéria požadovaná v uvedených oborech a koneckonců vedly k novým vědeckým poznatkům, které byly také z velké části publikovány.



Konkrétní přínosy práce reprezentují:

- (1) Popis 14 metabolitů – biomarkerů MCADD, šesti známých acylkarnitinů a osmi oxidovaných fosfatidylcholinů v suchých krevních skvrnách,
- (2) Efektivní, rychlá identifikace čtyř metabolitů u pacientů s ADA pomocí metody spektrálních stromů včetně nového metabolitu 1-methyl-5-oxoadenosinu,
- (3) Experimentální a teoretické studium vlivu rozlišení a skenovací rychlosti spektrometru na počet metabolitů, resp. jejich charakteristik, detekovaných v krevní plasmě, která ukázala, že rozlišení 60000-120000 (FWHM) je plně dostačující pro efektivní detekci analytů v matici.

Předložená práce představuje ucelené, logicky a přehledně uspořádané dílo, připravené na odpovídající odborné, formální a jazykové úrovni.

Další komentář by si podle mého názoru zasloužily tyto otázky:

- (1) 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.
- (2) Str. 40, Tab. 3 a Tab. 1 v Talantě: může přiřazené elementární složení MH⁺ iontů 623.5091 a 639.4089 odpovídat skutečnosti? Pomohla by interpretaci spekter oxidovaných fosfolipidů metoda spektrálních stromů?
- (3) Str. 54, Obr. 28 odpovídá zcela spektrálnímu stromu 2-deoxyadenosinu na Obr.32, nikoli tedy samotnému adenosinu. Bylo by možno porovnat spektrální stromy všech čtyř zkoumaných metabolitů ? Jaký publikační výstup bude realizován k tomuto tématu ?

Po důkladném prostudování dizertační práce a příslušných publikací předložených autorem konstatuji podle příslušných ustanovení Studijního a zkušebního řádu doktorského studijního programu LF UP, že práce splňuje všechny uvedené požadavky, a proto

DOPORUČUJI PRÁCI K OBHAJOBĚ.



BIOLOGICKÉ CENTRUM AV ČR, v. v. i.

Pokud práce bude úspěšně obhájena, doporučuji udělení akademického titulu doktor, ve zkratce Ph.D. podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 118/98 Sb.

V Českých Budějovicích dne 1. června 2017.

RNDr. Petr Šimek, CSc.

Vedoucí oddělení Analytická chemie a metabolomika

Biologické centrum AV ČR, v.v.i.

Branišovská 31

370 05 České Budějovice

simek@bclab.eu