

Oponentský posudek k diplomové práci Bc. Ladislava Kuchaře: Tandem mass of sphingolipids and its application and related diseases.

Diplomová práce s výše uvedeným názvem si vzala za cíl připravit specifické sfingolipidní standardy pro tandem MS pro kvalitativní a kvantitativní analýzu sulfatidů u lysosomálních střeďacích onemocnění spojených s hromaděním sulfatidů.

K tomu diplomant zvolil následující postup: připravil enzymový reaktor imobilizací sfingolipid ceramid deacylasy na magnetickou perlovou celulosu a SiMAG carboxyl následovalo otestování a srovnání parametrů enzymových reaktorů, byla provedena enzymatická semisyntéza interních standardů pro MS nevyskytujících se v lidských tkáních a komerčně nedostupných, tj. sulfatidů s acylem C17:0. Použití enzymového reaktoru a příprava standardu pomocí enzymatické semisyntézy vedla k dobrým výtěžkům standardu bez vedlejších příměsí, ke kterým dochází při chemické syntéze.

Připravený standard byl použit při analýze isotypové skladby sulfatidů u pacientů s poruchami katabolismu sulfatidů a kontrolních pacientů.

V diagnostické praxi jako předběžný test při podezření na střeďání sulfatidů se prováděl jejich průkaz v močovém sedimentu chromatografií na tenké vrstvě. Použití tandem MS s připraveným standardem C17:0 sulfatidů představuje velmi moderní postup, pomocí něhož bylo možno prokázat nejen celkový obsah sulfatidů, ale i jednotlivé isotypy v různých acyly. Srovnáním isotypů u pacientů se střeďáním (metachromatická leukodystrofie a defekty saposinů) proti kontrolním vzorkům se diplomantovi podařilo prokázat nejen hromaděni sulfatidů, ale i posun isotypů sulfatidů k těm s delšími mastnými kyselinami. V této části práce otevírá možnost pokračování ve výzkumu.

V diplomové práci jsem nacházel minimum chyb: pro gangliotetraosyl ceramid (asialogangliosid GM1) je nevhodné používat jako zkratku AGM1, v literatuře je používáno GA1 (jak je v této práci na obr. 5) přijatelné je asialo-GM1, nejlepší je Gg₄Cer. Na str. 34 je NaCNBH₃ místo NaCNBH₄. Na str. 69, 6-7 řádka zdola: k textu *...was newly studied by tandem MS in this work* nepatří odkaz na práci Philippart M., et al. [100].

Moje otázka: Popisujete případ suspektního deficitu prosaposinu s 3x vyšším střeďáním sulfatidů než u metachromatické leukodystrofie s tím, že potvrzení diagnózy je potřeba ještě potvrdit. Na jakých zjištěních je zatím založeno podezření na deficit prosaposinu.

Zvláště kladně hodnotím to, že diplomant použil při vypracování diplomové práce řadu moderních postupů, správnost a reprodukovatelnost jednotlivých kroků postupu pečlivě prověřil, přinesl vlastní varianty postupů. Zjištění posunu isotypů sulfatidů s delšími mastnými kyselinami má šanci po určitém dopracování na publikaci v dobrém impaktovaném časopise.

V posledním odstavci diskuse se diplomant zamýšlí nad tím, že podobnou enzymatickou semisyntézou lze připravit isotopicky značené isotypy sulfatidů a dalších sfingolipidů pro dynamické metabolické studie. Spolu s dalšími metodami zde navrhovanými je to dobré téma dalšího výzkumu v kterém, doufám, bude jmenovaný pokračovat v postgraduálním studiu pod vedením svých školitelů.

Posudek vypracoval dne 22. května 2006

Doc. RNDr. František Šmíd, CSc.
Ústav klinické biochemie 1. LF UK