Oponentský posudek disertační práce Mgr. Ladislava KUCHAŘE „Tandem mass spectrometry of sphingolipids with application for metabolic studies of sphingolipidoses“

Disertační práce Mgr. Ladislava Kuchaře se zabývá velmi významnou vědeckou problematikou. Jedná se o využití hmotnostní spektrometrie (MS) jako nástroje pro výzkum a diagnostiku metabolických poruch a chorob, které z nich vycházejí. Konkrétně využití této metody pro kvalitativní a kvantitativní analýzy sfingolipidů (SFL) pro výzkum a diagnostiku chorob metabolismu lipidů. Pro zavedení metody hmotnostní spektrometrie pro tyto účely musel kolega Kuchař nejdříve připravit lipídní hmotnostně značené standardy a optimalizovat a validovat metodu hmotnostní analýzy pro jejich stanovení. Pro syntetu bylo užito zejména semienzymové syntehy, za použití imobilizovaného enzymu lipidních substrátů, sfingolipid ceramid N-deacetylasu. Vyvinuté metody pro stanovení připravených standardů pak byly použity pro kvantitativní stanovení sfingolipidů v tkáních (např. v pitévních vzorcích tkání), lidských buňkách a moči pacientů trpících některými z lysosomálních střídavých onemocnění. Tato stanovení pak vedla k získání unikátních poznatků, např. prokázání zvýšení toxického lyso-SFL v myokardu pacienta s Fabryho chorobou, potvrzení specifické úlohy apikálního pól placentačních endothelií či využití hmotnostních metod pro určení aktivit lysosomálních enzymů. Z výsledků práce jednoznačně vyplývá, že v průběhu vypracovávání disertační práce byla vyvinuta a zavedena široká paleta metod, které jsou vhodné pro sledování metabolismu sfingolipidů za normálních a pathologických stavech lidských jedinců, a mohou tak přispět k vysvětlení molekulárních mechanismů chorob metabolismu lipidů. Z tohoto hlediska hodnotím předkládanou disertační práce za vysoce významnou studii, esenciální pro rozvoj diagnostiky a léčení studovaných metabolických chorob.

Z disertační práce je patrné, že disertant je kvalitním pracovníkem, který se může uplatnit v řadě laboratoří biochemického a biomedicínského výzkumu. Z práce jasně vyplývá, že musel zvládnout širokou škálu metodik, které jsou nezbytné jak pro semi-synthesu a
charakterizaci lipidních hmotnostně značených standardů a hmotnostní analýzy těchto sloučenin v biologickém materiálu (biologických vzorcích, které musely být pro stanovení vhodně upraveny). Kladně cením komplexní řešení studované problematiky.


K práci mám následující dotazy, které předkládám především jako podklad pro diskusi:

1) Standardy pro hmotnostní analýzy lipidních metabolitů byly připraveny pomocí imobilizované sfingolipid ceramid N-deacetylas, a to s vysokou kvalitou získaných sloučenin. Využití takto imobilizovaného enzymu je tedy ideální pro semienzymové syntézy studovaných sloučenin. Jaký je názor disertaanta na otázku, zda by imobilizovaný enzym mohl být využit i pro kinetické studie.
2) V práci byly analyzovány lidské tkáně a modelově také lidské fibroblastické buňky. Jak hodnotíte validitu tohoto buněčného modelu ve srovnání se vzorky tkání?

Závěr:

V Praze, 10.11.2013
Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.
katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze