

Doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra analytické chemie;
VFN v Praze, Ústav soudního lékařství a toxikologie, Oddělení toxikologie

Oponentský posudek doktorské disertační práce

Mgr. Jana Bártlá „Využití HPLC a LC-MS/MS metod v diagnostice dědičných metabolických poruch“
předložené k obhajobě na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty UK v Praze.

Disertační práce Mgr. Bártlá se zabývá dvěma skupinám analýz, které se společně zabývají obecnějším tématem screeningu a diagnostiky dědičných metabolických poruch. Předkládaná práce je doplněním a rozšířením dvou prací, jedné již publikované a druhé v recenzním řízení (pravděpodobně v době obhajoby již přijatá k tisku). Prvním cílem práce je rozšíření možností laboratorní diagnostiky poruch metabolismu purinů, konkrétně pak dědičné xantinurie. V druhém tématu se autor věnuje vývoji a použití instrumentální analytické metody analýzy významných metabolitů homocysteinu pro účely diagnostiky homocysteinurií ze suché krevní kapky.

Na řešení disertační práce byly zvoleny moderní prostředky instrumentální analytické chemie zahrnující moderní techniky zpracování vzorků, vysokoúčinné kapalinové chromatografie s optickou a hmotnostně spektrometrickou detekcí, takže práce správně tematicky zapadá do oblasti aplikované analytické chemie.

Práce je poměrně stručná, vhodně strukturovaná a podává dostatečný náhled na základy řešené problematiky. Jako přílohy práce jsou prezentovány 2 publikace, jedna již otištěná a druhá v recenzním řízení. Práce rovněž obsahuje přehled publikační činnosti autora (5 článků v recenzovaných časopisech, 1 článek v recenzi, 7 posterových sdělení).

Hlavním přínosem předkládané práce je:

- (a) praktické zavedení HPLC metody kvantitativní analýzy biochemických markerů xantinurie (hypoxantinu, xantinu, allopurinolu, oxopurinolu, pterinu a isoxantopterinu), umožňující navíc rozlišení 7 typů této metabolické poruchy;
- (b) praktické zavedení HPLC-MS/MS metody kvantitativního stanovení metabolitů methioninu umožňující screening dědičných metabolických poruch, rychlou diagnostiku homocystynurie s lokalizací poruchy v metabolické dráze a monitoring diagnostikovaných pacientů při jejich léčbě;
- (c) určení referenčního rozmezí cystathioninu v suché krevní kapce.

Práce je zpracována čtivou formou s minimem formálních chyb.

K práci mám následující formální poznámky, dotazy a připomínky.

1. V obrázku 2.2 na str. 14 chybí ve strukturních vzorcích purinového a allopurinového skeletu vodíky na atomu N v pozici č. 9.

2. Na str. 27 v kapitole 5.1.1 je uvedeno, že „Hodnota pH mobilní fáze byla upravena pomocí přidavku kyseliny octové na 4,8“. Jelikož se jedná o směsnou mobilní fázi z vodné a organické části, není jasné, zda bylo pH upraveno pH vodné části mobilní fáze před jejím smísením s organickou částí, nebo až potom. Teprve z popisu obrázku 5.3 je patrné, že pH bylo upraveno jen ve vodné části mobilní fáze.
3. U obrázku 5.1 na straně 28 chybí údaj o koncentraci použitých roztoků. U kyseliny močové překvapuje absorbance vyšší než 1,5. Je absorpční molární koeficient kyseliny močové opravdu o tolik větší než u hypoxanthinu a xanthinu?
4. Byly všechny analyty uvedené v tab. 5.1 a obrázku 5.3 kvantifikovány na základě kalibrace? Bohužel zde chybí informace o citlivosti a koncentračním rozsahu metody.
5. V práci je na některých místech (popisek obr. 5.5) použito označení molární koncentrace M, které není IUPAC doporučováno. Je předepsáno výhradně užití jednotek mol/l případně mol.l⁻¹.
6. V kapitole 5.1.3 není u stanovení aktivity xanthindehydrogenasy v plazmě uvedena koncentrace použitého roztoku pterinu.
7. Mají být v popisu obrázku 5.6 uvedeny správně koncentrace analytů nebo jejich absolutní množství?
8. V obrázku 1 na str. 67 bych doporučil pro vyjádření extrakčního výtěžku nikoliv koncentrace, ale %, jak bývá obvyklé.
9. U výsledků presentovaných v tabulce 3 na str. 66 by bylo zajímavé provést PCA nebo nějakou podobnou analýzu pro poměr Met/Cyst. Taková vizualizace hodnot by názorněji ukázala účinnost použité metody.

Dále mám na autora práce následující dotazy:

1. Je označení hyperhomocysteinémie (uvedené v abstraktu práce) a homocystinurie (uvedené v cíli práce) ekvivalentní, nebo se jedná o dvě odlišné poruchy metabolismu?
2. Je něco známo o distribuci analytů v suché krevní kapce? Jaký je zhruba podíl použité plochy výseče z DBS na celé ploše DBS a je tato hodnota konstantní? Má velikost výseče nějaký významnější vliv na citlivost metody? Přineslo by použití celé plochy DBS k analýze zlepšení citlivosti?
3. Přináší použití extraktu DBS menší pozorovatelné zatížení vzorku biologickou maticí oproti použití krevní plazmy při HPLC-MS/MS měření?
4. Jak se při diagnostice homocystinurie pomocí poměru Met/Cysta postupuje, pokud jsou hodnoty na hranici mezi kontrolou a defektem?

Závěrem konstatuji, že předložená práce svým obsahem a výsledky splňuje podmínky předepsané pro doktorskou disertační práci. Práci doporučuji k obhajobě a navrhuji udělit autorovi vědecký titul Ph.D.

V Praze, 2.9.2014


doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.