

Mgr. Josef Bártl:

Využití HPLC a LC-MS/MS metod v diagnostice dědičných metabolických poruch

Disertační práce Mgr. Josefa Bártla je věnována vývoji nových analytických metod pro zjišťování metabolických poruch, jejichž příčinou bývá geneticky podmíněná porucha funkce enzymu či transportního proteinu. Včasné diagnostika těchto poruch je velmi důležitá a vyžaduje úzkou spolupráci mezi lékaři a specializovanými laboratořemi. Uchazeč se zaměřil na dvě oblasti, a to diagnostiku dědičné xanthinurie a na metody stanovení homocysteinu, methioninu a cystathionu.

Disertační práce je založena na dvou publikovaných odborných článcích v mezinárodně uznávaném časopise (*Clinica Chimica Acta*, IF₂₀₁₃=2.764), které jsou doplněné úvodem, popisem použitých metod a diskusí výsledků. Celkově má disertační práce 39 stránek textu a 32 stránek příloh. Poměrně nezvyklé je řazení citované literatury bezprostředně za jednotlivými kapitolami (běžnější je souhrnné uvádění citací na konci práce). Úvodní kapitoly představují problematiku dědičných metabolických poruch, přičemž pozornost je věnována zejména metabolismu a poruchám metabolismu purinů a homocysteinu. Dále je představena technika kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a analýza vzorků ve formě suché kapky krve. Úvodní kapitoly jsou napsány stručně, avšak přehledně. Získané výsledky autor následně diskutuje a komentuje na 10 stranách. Vytknout lze drobné formální nedostatky, překlepy a chyby, např. použití zkratky DDT pro dithiotreitol (str. 4 a 19; správně má být DTT), nekonzistentní způsob zobrazení strukturních vzorců (jiná tautomerní forma na Obr. 2.2 (laktim) a Obr. 5.5 (laktam)). Překlep je např. v anglickém výrazu pro GC-MS (str. 4). Neutrální ztrátu nelze charakterizovat veličinou m/z , ale jednotkou Da nebo u (str. 24: ... 102 m/z , má být ... 102 Da). Celkově však práci hodnotím příznivě, uchazeč dosáhl vědecky cenných výsledků a vypracoval analytické metody, které jsou již nyní používány v diagnostice studovaných poruch.

K disertační práci mám několik dotazů:

1/ U metody stanovení purinových metabolitů je zmíněna nutnost pečlivé optimalizace pH pro dosažení optimální separace analytů a jejich oddělení od mnoha interferentů přítomných v moči. Pro identifikaci látek byla kromě retenčního času využita i jejich UV spektra měřená detektorem s diodovým polem. Byl rutinně prováděn "peak purity" test, tj. kontrola UV spektra v jednotlivých částech píku analytů, aby se odhalily případné koeluce? (str. 29-30)

2/ V případě allopurinolového testu byl produkt reakce kvantifikován pomocí jednobodové kalibrace. Byla tato kalibrace dostatečná pro získání spolehlivých výsledků? (str. 31)

3/ Při stanovení markerů metabolismu homocysteinu byly v případě deuterovaného methioninu v MRM chromatogramu detekovány dva píky. Čemu odpovídá první pík s $t_R \sim 2$ min? (str. 35)

4/ Co autor rozumí pod pojmem "nastavení trojitého kvadrupólu"? Jedná se pouze o určení optimální kolizní energie, nebo i o ladění iontové optiky ve zdroji přístroje? (str. 35)

5/ Analýza ze suché kapky krve klade vysoké nároky na citlivost analytické techniky. Mohl by uchazeč komentovat případné použití nanoelektrospreje (a nano-HPLC) v diagnostice dědičných metabolických chorob? Jeho zavedením by se mohla podstatně zvýšit citlivost a snížilo by se množství vzorku pro analýzu.

Závěrem konstatuji, že předložená disertační práce Mgr. Josefa Bártla přináší kvalitní vědecké výsledky a jím vyvinuté metody nacházejí praktické uplatnění v diagnostice a výzkumu dědičných metabolických poruch. Autor publikoval několik článků v renomovaných odborných časopisech, u jednoho je prvním autorem. Výsledky své práce dále prezentoval na českých i mezinárodních konferencích. Lze shrnout, že uchazeč prokázal připravenost k samostatné vědecké činnosti a proto jeho disertační práci **doporučuji přijmout k obhajobě.**

V Praze dne 24. srpna 2014



.....

doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.