

Posudek na disertační práci

Název práce: Lipidomic analysis of vernix caseosa

Autor: Mgr. Eva Harazim

Školitel: doc. RNDr. Josef Cvačka, Ph.D.

Konzultant: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Tématem předkládané disertační práce je využití analytických metod pro identifikaci lipidů ve vzorku novorozeneckého mázku. Novorozenecký mázek má celou řadu důležitých funkcí, které jsou zásadní pro ochranu a správný vývoj plodu. Jeho složení nebylo doposud spolehlivě popsáno, což by mohlo vést k lepšímu pochopení jeho vlastností a následně jeho případnému využití ve farmacii. Práce autorky a celého vědeckého týmu je zaměřena na postupnou charakterizaci složení lipidů novorozeneckého mázku, které představují jeho hlavní složku. Z hlediska složení lipidů představuje vzorek extrémně složitou směs, která obsahuje velké množství lipidů a především množství různých izomerů, jejichž identifikace je v tak složitém vzorku pro analytického chemika velmi obtížná.

Práce je sepsána v anglickém jazyce a je rozdělena do třech základních částí. V úvodní části práce autorka seznamuje s lipidy, jejich definicí a strukturou. Dále stručně popisuje možnosti lipidomické analýzy zahrnující extrakci lipidů ze vzorku a základní chromatografické techniky a separační módy používané pro separaci a identifikaci lipidů. Dále je popsáno využití hmotnostní spektrometrie v analýze lipidů, popis základních ionizačních technik, hmotnostních analyzátorů a možnosti určení polohy dvojně vazby. Poslední část úvodu je zaměřena na problematiku novorozeneckého mázku, jeho výskyt, vlastnosti a složení. Další část práce představuje souhrn výsledků a jejich diskuzi. Autorka popisuje výsledky extrakce lipidů ze vzorku, charakterizaci složení mastných kyselin, separaci tříd lipidů, postup identifikace nových tříd lipidů a detailní charakterizaci tříd lipidů zahrnující identifikaci acylů, lokalizaci dvojných vazeb a větvení řetězců. V poslední části jsou přiloženy tři publikované práce autorky, jedna práce v probíhajícím recenzním řízení a dva konferenční příspěvky. Výsledky práce V a VI jsou popsány v diskuzi.

Práce je logicky a přehledně členěna, psána srozumitelně, s minimálním množstvím chyb nebo překlepů. Dovolím si upozornit pouze na několik drobných nedostatků, které však nijak zásadně nesnižují kvalitu práce:

- v celé práci je často používán termín *resolution* v souvislosti s rozlišovací schopností přístrojů, ale správně se jedná o *resolving power*
- str. 17, kapitola *Reversed-phase LC* – interakce analytu je s pevnou stacionární fází, ne s kapalnou
- v některých kapitolách postrádám informaci, na jaké třídy lipidů mohou být jednotlivé techniky/separační módy aplikovány, např. *NP-LC*, *ESI* a *APCI*
- prezentované chromatogramy frakcionace lipidů jsou zcela bez popisu píků

Předkládaná disertační práce vychází ze třech prací publikovaných v mezinárodních odborných impaktovaných časopisech vysoké kvality, které již prošly nezávislým oponentským řízením. Dále je jedna práce v recenzním řízení a dvě práce jsou v přípravě. U zmíněných prací je autorka dvakrát prvním autorem s hlavním podílem práce a k ostatním pracím přispěla menší částí v rámci širšího autorského kolektivu. Práce byla autorkou publikována i ve dvou konferenčních příspěvcích. Považuji za důležité zdůraznit, že kromě detailního popisu již známých tříd lipidů ve vzorku novorozeneckého mázku, se podařilo identifikovat a detailně popsat i třídy dosud ve vzorku nepopsané, jako jsou 1-*O*-acylceramidy a cholesterolestery ω -(*O*-acyl)hydroxykyselin. Jejich identifikace je velmi obtížná kvůli komplexnosti vzorku a také tím, že se tyto třídy lipidů běžně v ostatních lidských tkáních nevyskytují a nejsou tak dobře popsány. Dalším důležitým přínosem práce je aplikace již vyvinutých metod na identifikaci některých izomerů lipidů novorozeneckého mázku, jejichž funkce se v organismu mohou zásadně lišit. Byly popsány polohy dvojných vazeb triacylglycerolů a 1,2-diesterů diolů a dále byly provedeny experimenty s cílem určit polohy větvení řetězců.

K práci mám následující dotazy a náměty k diskusi:

1/ Autorka v práci nezmiňuje možnost využití UHPLC techniky v lipidomické analýze, která se velmi rychle stává běžnou součástí laboratoří a i v lipidomické analýze se využívá velmi často. V této souvislosti bych si dovolil položit otázku, jestli a případně jaké výhody by mohlo mít využití této techniky v identifikaci lipidů a jejich izomerů u tak složitěho vzorku jako je vzorek novorozeneckého mázku.

2/ Autorka popisuje koncept retenčního chování lipidů v RP-LC pomocí ECN. Lze tento koncept aplikovat na všechny třídy lipidů?

3/ Metoda lokalizace dvojných vazeb je založena na fragmentaci aduktů s acetonitrilem pomocí APCI ionizace. Velmi často je pro lipidomické analýzy používána ESI ionizace, která je charakteristická vysokými intenzitami různých aduktových iontů. Je nějaký potenciál u těchto aduktových iontů pro lokalizaci dvojných vazeb pomocí ESI ionizace? Mělo by případně význam přidávat nějaké aditivum do mobilní fáze nebo přídavnou kapalinu?

Závěrem mohu s potěšením konstatovat, že předložená práce splňuje všechny obvyklé požadavky, proto

disertační práci **doporučuji k obhajobě.**

V Pardubicích, 18. 8. 2017

Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.
Katedra analytické chemie
Fakulta chemicko-technologická
Univerzita Pardubice
Studentská 573
Pardubice 532 10