



KATEDRA BIOCHEMIE

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Hlavova 2030
CZ-128 40 Praha 2

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 analýsy sfingolipidů (SFL) pro výzkum a diagnostiku chorob metabolismu lipidů. Pro zavedení metody hmotnostní spektrometrie pro tyto účely musel kolega Kuchař nejdříve připravit lipidní hmotnostně značené standardy a optimalizovat a validovat metodu hmotnostní analýsy pro jejich stanovení. Pro syntézu bylo užito zejména semienzymové syntézy, za použití imobilizovaného enzymu lipidních substrátů, sfingolipid ceramid *N*-deacetylasy. Vyvinuté metody pro stanovení připravených standardů pak byly použity pro kvantitativní stanovení sfingolipidů v tkáních (např. v pitevních vzorcích tkání), lidských buňkách a moči pacientů trpících některými z lysosomálních stárádavých 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 pólu placentálních 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 patologických 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 biomedicálního výzkumu. Z práce jasně vyplývá, že musel zvládnout širokou škálu metodik, které jsou nezbytné jak pro semi-syntézu a

charakterizaci lipidních hmotnostně značených standardů a hmotnostní analýsy těchto sloučenin v biologickém materiálu (biologických vzorcích, které musely být pro stanovení vhodně upraveny). Kladně cením komplexní řešení studované problematiky

Výsledky disertační práce Mgr. Ladislava Kuchaře plně odpovídají vytčeným cílům a, jak jsem již zmínila, jsou originální z řady hledisek. O tom svědčí jejich publikace v renomovaných vědeckých časopisech. Hodnocení práce mě usnadnila právě tato skutečnost; výsledky získané při vypracování disertační práce již byly publikovány ve formě čtyř časopiseckých publikací ve vědeckých časopisech s kvalitním impaktovým faktorem (Rapid Commun Mass Spectrom, IF 2.509, Am J Med Genet A, IF 2.304, Clin Chim Acta IF 2.850 a Glycobiology IF 3.537), další práce byla publikována jako kapitola v knize a další je současná publikace - konsensu expertů - v časopise Chem Inher Metab Dis. Výsledky práce tedy prošly náročným recenzním řízením v jednotlivých těchto časopisech (knize). Na čtyřech pracích je kolega Kuchař prvním autorem. To ukazuje i jeho vysoký podíl na uvedených publikacích. Výsledky práce disertanta proto hodnotím velice vysoko.

Disertační práce Mgr. Ladislava Kuchaře je jak po stránce formální tak i obsahově velmi kvalitně vypracována. Je psána způsobem, který považuji za vhodný pro doktorské disertační práce, kdy většina výsledků již byla publikována. Disertační práce je koncipována, po úvodní teoretické části (23 stran), jako komentář k publikovaným pracem (23 stran), a zakončena závěry práce (4 strany). Přiloženy jsou pak separáty publikovaných výstupů. Je psána kvalitní angličtinou, srozumitelně a získané výsledky jsou adekvátně diskutovány. Z disertační práce je patrné, že kandidát je kvalitně připraven pro vědeckou práci ve studované oblasti a bude, dle mého názoru, platným členem jakékoliv laboratoře, kde jsou používány metody hmotnostní analýsy pro biochemické účely. Z celkového řešení zvolené problematiky je zcela evidentní, že nejen kandidát, Mgr. Ladislav Kuchař, ale i školící pracoviště, kterého je členem, je třeba z hlediska kvality vědecké práce hodnotit velmi vysoko.

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

- 1) Standardy pro hmotnostní analýsy lipidních metabolitů byly připraveny pomocí imobilizované sfingolipid ceramid *N*-deacetylasy, a to s vysokou kvalitou získaných sloučenin. Využití takto imobilizovaného enzymu je tedy ideální pro semienzymové synthesy studovaných sloučenin. Jaký je názor disertanta 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:

Disertační práce Mgr. Ladislava Kuchaře je kvalitní vědeckou prací. Dle mého názoru práce rozhodně splňuje požadavky kladené na práce obdobného typu. Přináší původní vědecké výsledky, které již také byly publikovány. Proto ji doporučuji k přijetí k obhajobě. Doporučuji rovněž, aby byl na základě úspěšné obhajoby předložené práce Mgr. Ladislavu Kuchařovi udělen, dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb., akademický titul doktor ve zkratce **Ph.D.** v oboru **Biochemie a pathobiochemie.**



V Praze, 10.11.2013

Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK v Praze