

„Využití plynové chromatografie pro stanovení mastných kyselin a některých xenobiotik“

Předložená disertační práce Mgr. M. Jačeka se zabývá plynově-chromatografickým stanovením mastných kyselin v různých analytických maticích. Mimo standardně stanovovaných typů mastných kyselin se autor se zaměřil také na možnosti stanovení *trans*- izomerů. S ohledem na stálý zájem o nutriční vliv těchto sloučenin lze považovat zvolené téma práce za aktuální. Mimoto se stále více ukazuje význam mastných kyselin, hlavně polynenasycených, jako prekurzorů pro důležité metabolické dráhy.

Autor zvolil klasický formát disertace, po poměrně obsáhlém teoretickém úvodu a cílech disertace je podrobně popsána metodika (nejsou zde ovšem zmíněny hypotézy, které musíme vyvozovat z původních prací připojených na konci disertace). Experimentální část práce spočívá v analýzách různých matic pomocí GC-FID, které byly doplněny dalšími postupy – extrakčními a syntetickými technikami.

Výsledky práce jsou prezentovány v další části disertace. Primárně vycházejí ze tří publikací v impaktovaných časopisech, u jedné z nich je autor disertace prvním autorem. Disertační práce má i klinickou část, která se věnuje změnám profilů mastných kyselin lipidových tříd ve vybraných maticích za různých nutričních stavů (veganství, dietní intervence) a složení mateřského mléka. Disertace celkem obsahuje 24 obrázků a 16 tabulek (jako obrázek 11 jsou v textu práce označeny dva různé obrázky), text práce má celkem 128 stran a 3 přílohy.

Z hlavních výsledků disertace lze uvést:

Experimentální část

1. Podařilo se syntetizovat *cis*- a *trans*- izomery kyseliny oktadecenové v polohách 4 až 14 (*trans*-izomery), a 6 až 14 (*cis*- izomery)
2. Byla vyvinuta metoda umožňující separaci některých izomerů kyseliny oktadecenové, a také geometrických izomerů kyselin linolové a α -linolenové.

Klinická část

3. V rámci studie OMEGA byly po 8-týdenní dietní intervenci PUFA α -3 u zdravých osob pozorovány změny zastoupení mastných kyselin v erythrocytech, které se odrazily ve zvýšení omega 3 indexu
4. Při monitorování změn v metabolismu mastných kyselin u veganů a omnivorů po intervenci aminokyselinami s větveným postranním řetězcem (studie VEGGIE-2) byly zjištěny změny v profilu mastných kyselin nejen ve třídě volných mastných kyselin v plazmě (zvýšený podíl kyseliny myristové u veganů), ale také fosfolipidů erythrocytů (zvýšení podílů kyselin palmitové a palmitolejové u omnivorů). Vegani mají oproti omnivorům snížený obsah TFA v triacylglycerolech tukové tkáně ($4,6 \pm 1,7$ vs. $7,7 \pm 1,5$ mg/g).
5. Stanovení *trans*- izomerů FA v mateřském mléce potvrdilo příznivý klesající trend obsahu těchto kyselin v potravinách a/nebo zlepšující se nutriční vzorce chování v ČR.

Po formální stránce je práce vypracována pečlivě, seznam literatury obsahuje celkem 196 citací, text je přehledně členěn a napsán velmi srozumitelně, i když se někde autor nevyvaroval chyb a překlepů. V kapitole Závěry autor jasně zformuloval závěry a dosažené výsledky, ze kterých vyplývá, že cíle disertační práce byly splněny. Krátce se též zmiňuje, proč se v této práci neprezentují analýzy xenobiotik, zmíněných v druhé části názvu disertační práce.

Otázky a náměty do diskuse:

Úvod

Doporučoval bych v textu sjednotit značení tříd mastných kyselin n-3 a n-6 nebo ω 3 a ω 6.

1. str. 46 značení ω 6, ω 3 je od metylového konce, ne od metylenového
2. str. 50 Obr. 9 z EPA by měly vznikat lipoxiny 5., nikoli 4. série
3. str. 52 Jaký je rozdíl mezi Δ 15 a ω 3 desaturasami?
4. str. 56 poměr C20:5n6/ARA má být C22:5n6/ARA

Experimentální část

1. Je známo, zda použitá metoda metylace pomocí acetylchloridu s metanolem ovlivňuje migraci, případně *cis-/trans-* izomerizaci dvojných vazeb v řetězcích mastných kyselin během metylace?
2. Použitý teplotní gradient pro systém dvou 100 m kolon je poměrně časově náročný. Kolik vzorků bylo možno na tomto systému zanalyzovat?
3. Proč použité kalibrační sady (kapitola 3.6) obsahují buď C20:3n-3 (sada pro 15 m kolonu), nebo C20:3n-6 (sada pro systém 2 x 100 m)? Příslušné výsledky pak tyto mastné kyseliny nezahrnují. Ani jedna sada pak nezahrnuje C18:1n-7c.
4. Existují validační data pro metodu stanovení FAME na systému 2 x 100 m? Při takto dlouhé analýze jsou pravděpodobně větší korekce pro složky, které se eluují později. Navíc jako interní standard byla použita C13:0 s RT okolo 35 min (případně C17:0, jež má RT okolo 47 min), přičemž poslední stanovovaná látka, C22:6n-3, měla RT cca 155 min.
5. Jak by se daly vysvětlit vztahy mezi hodnotami citlivosti detektoru (Tabulky 7 a 8, parametry *a* či ARF) a strukturami analyzovaných FA, popřípadě preanalytickou fází? Použitá platforma GC-FID byla stejná.
6. Bude možné publikovanou metodu použít i pro separaci izomerů mastných kyselin s konjugovanými dvojnými vazbami, např. konjugované kyseliny linolové?
7. Nejsou uvedena data o složení krmných směsí. Je známo, že složení mastných kyselin v lipidových extraktech použité řasy *Trachydiscus minutus* závisí na podmínkách kultivace.

Výsledky

Obecné poznámky

1. Popisné charakteristiky obsahů FA jsou uváděny v některých tabulkách pouze ve formátu průměru bez směrodatné odchylky.
2. Jaké jsou jednotky pro absolutní koncentrace mastných kyselin v erythrocytech?

Studie OMEGA

1. Byly výsledky analýz mastných kyselin v rámci této studie již publikovány?
2. V textu není popsáno uspořádání studie. Jaký byl časový rozestup mezi jednotlivými odběry a jaký byl stav intervence v jednotlivých časových bodech?
3. Jak lze vysvětlit, že hodnota omega 3 indexu (z dat v Tab. 10) po intervenci je u sledované i kontrolní skupiny stejná, přibližně 5,8 %?

Studie VEGGIE-2

1. Metoda pro stanovení FFA použitá v této studii vykazuje podle zkušeností z naší laboratoře některé nepříznivé validační charakteristiky. Byla kontrolována síla testu pro publikovaná data? Velikost souboru ($n = 10-11$ v Příloze 3) je totiž poměrně malá a rozptyl dat velký.

2. Jak si autor vysvětluje fakt, že zvýšený podíl kyselin palmitové (C16:0) a palmitolejové (C16:1n-7) ve fosfolipidech erytrocytů u kontrolní skupiny po intervenci (Obr. 15) nebyl doprovázen analogickými změnami v podílech kyseliny stearové (C18:0) a hlavně olejové (C18:1n-9)?

Analýzy tukové tkáně

1. Tab. 15. Čím by mohl být způsoben poměrně výrazný rozptyl hodnot pro sumu FA v mg/g tukové tkáně, která by měla obsahovat výraznou většinou pouze TAG?

Závěr:

Předložená práce dokladuje schopnosti autora samostatně vědecky pracovat a sdílet své výsledky s odbornou veřejností. I přes výše zmíněné připomínky práce Mgr. Martina Jačka odpovídá požadavkům kladeným na disertační práci, a proto doporučuji, aby byla přijata k obhajobě a po úspěšné obhajobě byla postoupena pro řízení k udělení vědeckého titulu PhD.

V Praze 29.4.2020



RNDr. Marek Vecka, PhD.