



## Posudek na disertační práci

Název práce: Vývoj hmotnostně-spektrometrických metod pro strukturní analýzu mastných kyselin a estolidů

Autor: Mgr. Lukáš Cudlman

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

Konzultant: prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Předkládaná disertační práce Mgr. Lukáše Cudlmana se zabývá využitím nových hmotnostně-spektrometrických metod pro strukturní analýzu izomerů mastných kyselin a estolidů triacylglycerolů. Jedná se o práci na aktuální téma v lipidomické analýze, protože charakterizace izomerů je důležitá z hlediska pochopení jejich rozdílného biologického účinku a jejich případného vlivu na vznik a průběh závažných onemocnění. Autor využil v práci pokročilých metod hmotnostní spektrometrie pro analýzu lipidů ve vzorku novorozeneckého mázku, který zastává důležité funkce při vývoji plodu, ale má i velký potenciál pro využití v klinické praxi. Jedná se o nesmírně komplexní vzorek, který představuje náročný úkol pro současné metody analytické chemie. Práce vznikla na pracovišti ÚOCHB, kde se vývojem nových metod i charakterizací lipidomu novorozeneckého mázku dlouhodobě úspěšně zabývají.

Disertační práce je členěna klasickým způsobem na kapitoly teoretická část, experimentální část a výsledky a diskuze. V teoretické části autor podává přehled o strukturách, názvosloví a vlastnostech lipidů. Dále popisuje jednotlivé kroky analýzy lipidů, od jejich extrakce až po aktuálně využívané metody pro strukturní analýzu vybraných tříd lipidů, a vysvětluje funkce novorozeneckého mázku. U této kapitoly oceňuji stručný a zároveň výstižný popis jen nejdůležitějších metod týkajících se tématu práce. Všechna diskutovaná témata jsou dostatečně podložena odpovídající literaturou. Experimentální část práce popisuje základní informace o provedených experimentech. V části výsledky a diskuze autor popisuje způsob využití jednotlivých metod pro charakterizaci struktury lipidů, které jsou podloženy názornými příklady. Použité metody pro strukturní analýzu jsou zaměřeny do dvou směrů, konkrétně na využití derivatizace mastných kyselin a analýzu vzniklých derivátů, a na analýzu intaktních lipidů na základě různých aduktových iontů vzniklých v iontovém zdroji. Pro strukturní analýzu byly testovány různé typy fragmentačních metod. Autor v práci přehledně prezentuje principy jednotlivých metod, jejich výhody a omezení pro strukturní analýzu a důležité závěry. Metody jsou vyvíjeny a testovány na vybraných standardech a dále využity pro strukturní analýzu lipidů ve vzorku novorozeneckého mázku.

Prezentovaná práce autora je na vysoké odborné úrovni z hlediska analytické chemie a hmotnostní spektrometrie, díky čemuž se například podařilo popsat řadu dosud neznámých mastných kyselin. Práce je psaná čtivou formou na vysoké jazykové úrovni. Zejména bych ocenil schopnost autora pro stručný, ale výstižný popis výsledků. Z celé práce bych upozornil jen na několik nepřesných formulací:

- ionty procházejí detektorem/správně dopadají na detektor; reverzní fáze/obrácené fáze; nástřík/dávkování; rozlišení/rozlišovací schopnost; opouštění kolony/eluce látek z kolony
- kap. 1.2.3 - UHPLC nemá vyšší účinnost a rychlejší separace díky vyššímu provoznímu tlaku, ale díky kolonám s velikostí částic pod 2  $\mu\text{m}$ , vysoký provozní tlak je důsledek jejich použití
- aktuálně je v metabolomice doporučeno používat termín „identifikace“ metabolitů pouze v případě potvrzení s identickým standardem, bez standardu se jedná o „anotaci“ metabolitu.



Na základě plagiátorské kontroly byla zjištěna podobnost práce 16% a 31%. Ta je v největší míře daná překryvem citované literatury, používanými zkratkami technik nebo popisem obecně platných definic. Žádná z nalezených podobností nijak nesnižuje originalitu předkládané práce.

Výsledky experimentů autora byly zatím publikovány ve dvou odborných článcích. První článek byl publikován v prestižním časopise Nature Methods (D1), kde je Mgr. Cudlman součástí širšího kolektivu autorů s 15% podílem. Na druhém článku v časopise Biomolecules (Q1) je prvním autorem s majoritním podílem 85%. Další dva články jsou aktuálně v přípravě. U prvního článku bude prvním autorem s podílem 80%, téměř finální rukopis byl přiložen k disertační práci. U poslední práce bude druhým autorem s podílem 50%. U všech publikovaných i připravovaných článků se jedná o komplexní a časově náročné práce, které zahrnují syntézu nedostupných standardů, interpretaci složitých hmotnostních spekter s popisem fragmentačních mechanismů a charakterizaci izomerů ve složitém vzorku. Z tohoto pohledu je objem získaných výsledků zcela dostačující. Autor dále během studia prezentoval několik přednášek a plakátových sdělení na vědeckých konferencích nebo byl řešitelem projektu Grantové agentury UK. Na základě výše popsaného autor dostatečně prokázal, že je schopen samostatné vědecké činnosti.

K předkládané práci mám následující otázky a náměty do diskuze:

- 1/ Jaký je podíl autora na OzID analýze mastných kyselin popisované v kapitole 4.1.2? Podle Author contribution v přiložené publikaci autor prováděl jen UVPD analýzu.
- 2/ Pro charakterizaci izomerů byly v práci použity LC metody s dlouhými gradienty (až 180 min) kvůli dostatečné separaci různých izomerů. Pro detailní analýzu složitých vzorků je to čas přijatelný, přesto jaké jsou možnosti pro zkrácení analýzy a jaká jsou omezení z hlediska použitých MS metod?
- 3/ Autor popisuje možnosti využití poměru fragmentových iontů po CID pro rozlišení sn izomerů TG-EST, což bylo potvrzeno pro různé aduktové ionty. Dá se očekávat podobné chování i pro fragmentaci iontu protonované molekuly?
- 4/ Využití iontové mobility nebylo součástí práce, přesto bych se rád zeptal, jak se autor dívá na její potenciál pro analýzu složitých izomerních směsí?
- 5/ Jaké jsou možnosti kvantitativní analýzy studovaných látek ve vzorku mázku?

Závěrem mohu konstatovat, že předkládaná práce Mgr. L. Cudlmana splňuje všechny požadavky kladené na disertační práce. Celkově hodnotím práci jako velmi zdařilou a bez výhrad ji **doporučuji přijmout k obhajobě.**

doc. Ing. Miroslav Lísa, Ph.D.  
Katedra chemie

V Hradci Králové dne 5. března 2024