

**Posudek Disertační práce RNDr. Aleše Tomčaly na téma:
Lipidome LC/MS Analysis in the Insect Adaptation and Development Studies.**

Předložená Disertační práce doktoranda RNDr. Aleše Tomčaly sestává ze dvou kompaktních celků: (a) Vlastního analytického měření, včetně vypracování vhodných analytických postupů pro izolaci a identifikaci lipidů z hmyzího materiálu a (b) aplikace získaných poznatků při zpracování konkrétních biologických vzorků původu hmyzího, ale i z jiných biologických materiálů. Tím je velmi dobře dokumentována možnost obecného využití vyvinutých analytických metod pro analýzu širokého spektra biologických vzorků, samozřejmě zaměřených na analýzu lipidů.

Práce předkládá logický vývoj analytických postupů od shrnutí stavu vědomostí v dané oblasti v úvodu práce, přes vývoj metodických postupů, jejich aplikaci v laboratorní praxi až po vyslovené závěry této práce. Disertační práce RNDr. Tomčaly je doplněna již vyšlými dvěma publikacemi, jakož i dvěma rukopisy v různém stadiu podání či přípravy, které jsou důkazem o rovnoměrné a úspěšné pracovní aktivitě doktoranda.

Přes řadu pozitiv, která tato předložená Disertační práce shrnuje, nemohu pominout ani určité výhrady, k nimž jsem při posuzování Disertační práce dospěl:

Formální stránka:

Práce je sepsána pečlivě. Úroveň anglického jazyka je velmi dobrá, nicméně se v práci vyskytuje poměrně vysoké množství gramatických nepřesností a chyb v hláskování. U jmen českých autorů by měla být zachována česká diakritika, což mnohde dodrženo nebylo.

Vložení separátů a rukopisů přímo do textu Disertační práce způsobem zde provedeným je velmi netypické řešení a podle mého názoru narušuje kontinuitu textu. Bylo by zřejmě vhodnější vložit již publikované práce a připravované rukopisy jako přílohy na konec Disertační práce a odkazovat na ně z textu Disertační práce.

Vědecká stránka:

Stav poznatků v dané oblasti je zpracován přehledně a dostatečně podrobně. Práce má jasně definované cíle, které na základě logického vývoje provedeného výzkumu naplňují zadaný úkol. Zvolená metodika práce odpovídá vhodnému řešení zadaného úkolu. Autor na základě systematické výzkumné práce vyvinul vhodnou analytickou metodologii pro identifikaci

cílových přírodních látek a tuto metodologii aplikoval s úspěchem při analýze konkrétních vzorků, jejichž analýza byla potřebná pro realizaci biologického výzkumu. Výsledky této práce, jak z oblasti vývoje metod, tak jejich praktické aplikace daly vznik dvěma publikovaným pracím a dvěma rukopisům, jakož i několika příspěvkům na konferencích.

K předložené Disertační práci mám tyto *dotazy*:

1. Je možné pomocí Vámi vyvinuté a používané metody analýzy fosfolipidů rozlišit α - a γ -linolenovou kyselinu? Všiml jsem si, že v tabulkách v závěru práce a v tabulkách v publikační příloze 4 uvádíte pouze pojem linolenová kyselina.

2. Existuje vysvětlení či hypotéza, proč dochází u hmyzu ke změnám koncentrací fosfatidylcholinu a fosfatidylethanolaminu způsobem, který v práci graficky znázorňujete, v závislosti na ročním období? Nemůže tato změna souviset i se změnou diety, pokud k takové změně diety dochází?

Závěr:

Závěrem chci konstatovat, že předložená práce, bez ohledu na výhrady, které jsem definoval v úvodu posudku, splňuje všechny náležitosti dané zákonem, a proto **doporučuji** předloženou **Disertační práci p. RNDr. Aleše Tomčaly** k přijetí a jako rozhodující podklad pro **udělení vědecké hodnosti PhD.**

V Praze dne 30. 11. 2009



Prof. Ing. Zdeněk Wimmer, DrSc.,
Isotopová laboratoř ÚEB AV ČR, v.v.i.

Oponentský posudek na práci RNDr. Aleše Tomčaly „Lipidome LC/MS analysis in the insect adaptation and development studies.

Práce Aleše Tomčaly se zabývá velmi náročným tématem, jímž je analýza lipidických složek v hmyzu. Téma považuji za náročné proto, že lipidických konstituentů je řada druhů a každý z těchto druhů vykazuje neobyčejnou vlastní diversitu. Zvládnutí metod jejich extrakce a analýzy tak samo o sobě představuje poctivý kus práce.

Předkládaná práce má celkem 72 stran. Uvnitř práce jsou 4 rukopisy s vlastním číslováním. Na straně 3 jsou formulovány cíle práce jimiž je vývoj analytických metod a následně jejich aplikace v oblastech chladové aklimatizace hmyzu a v průběhu experimentů s hormony. Za hlavní výsledek práce lze považovat 4 ukončené rukopisy, jenž jsou včleněny do disertace a u nichž byl Aleš Tomčala hlavním analytikem. Z těchto prací je patrné, že autor hlavní cíle splnil a dovedl analytiku do použitelné (a recenzovatelné) podoby.

Strukturu a členění vlastní práce však lze nejlépe označit v jazyku sepsání „user unfriendly“. Oponent by obvykle očekával úvod, který by presentoval dosud používané metody a diskutoval jejich případné nevýhody, dále pak jasně oddělenou experimentální část - vlastní práce autora a v závěru pak jakými metodickými vychytávkami autor k vývoji metod a při jejich aplikaci dospěl. Toho se ovšem oponent nedočká, což lze nejlépe ukázat na tom, že kap. 1.0 je úvod, následováno 2.0 „Cíle“ 4.1 úvod, 4.2. úvod a v dalších kapitolách 4 plynule narůstá podíl vlastní práce autora a vrcholí ve 4.6, což je rukopis práce. Následuje 5.0 (str. 33-43), což je opět úvod. Jako oponent jsem v tento moment zvolil jinou strategii, domnívaje se, že se zorientuji podle závěru práce. Nicméně, závěr je velmi stručný a v analytickém vývoji nás odkazuje na kapitolu 4.6. Podrobně jsem tedy přečetl rukopis simulující kapitolu 4.6, kde jsem na str. 7 rukopisu dostal k odkazu [46] vedoucímu k předchozí práci autora. Předchozí práci autora lze nalézt na straně 4102 následující stranu disertace 44....., zde jsou analytické části věnovány dva odstavce, bez toho, že by zde byl uveden analytický vývoj. Vzhledem k tomu, že jsem tedy ani vynaloženým úsilím nenašel zhodnocení vlastního vývoje metod oproti metodám publikovaným, požaduji provedení tohoto hodnocení při obhajobě.

Po formální stránce je práce psána velmi dobrou angličtinou, za což je třeba autora pochválit. Po stránce věcné je v práci několik drobných chyb, které lze označit spíše za překlepy, než chyby. Např. ve Fig. 14, str. 19, negativní ionty nejsou $[M+H]^-$, na str. 23 pravděpodobně není myšlen vážně ion $[M+NH_4-NH_4OH]$ (i když v součtu správně) nebo na str. 24 $[M-18]$ by nebyl $1+$. Těchto chyb je minimum. Po odborné stránce není pro průměrného čtenáře srozumitelně vysvětleno k čemu jsou dobré aduktové ionty $[M+NH_4]^+$

str. 18 a proč se třeba nepoužívají $[M+Na]^+$ inzerované na str. 17 a dále nezmiňované. Jako druhou otázku na disertanta tedy prosím, aby srozumitelně vysvětlil podmínky pro vznik aduktových iontů a následně komentoval jejich (rozdílnou) fragmentaci.

Přes zjevné výhrady k členění práce, považuji celkově práci Aleše Tomčaly za velmi dobrou, což prokázal zejména několika praktickými aplikacemi a několika velmi dobrými rukopisy. Doporučuji tedy práci Aleše Tomčaly k obhajobě.

V Českých Budějovicích 7.12. 2009

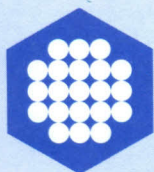


Alexandr Jegerov

Teva Czech Industries

Branišovská 31

České Budějovice



Doc. RNDr. Irena Valterová, CSc.

Oponentský posudek doktorské disertační práce RNDr. Aleše Tomčaly „Lipidome LC/MS Analysis in the Insect Adaptation and Development Studies“.

Předložená práce se zabývá tradičním tématem řešeným na pracovišti - změnami ve složení lipidů v závislosti na fyziologickém stavu hmyzu. Tato problematika se vyvíjí spolu s rozvojem separačních a analytických metod, přičemž získáváme stále nové poznatky, které pomáhají pochopit podstatu daných jevů. O aktuálnosti tématu svědčí i výčet v práci citované literatury, kde je 60 % článků z r. 2000 či novější.

Doktorand vypracoval nové moderní metody pro stanovení jednotlivých skupin lipidů jak polárních, tak i nepolárních. Velkým přínosem je, že doktorand stanovuje lipidy přímo bez předchozí transesterifikace, jak stále ještě vidíme v lipidářských člancích. Transesterifikace poskytuje jen omezenou informaci o mastných kyselinách bez určení, jak jsou tyto kyseliny vázány na glycerol. Nově vypracovanou metodikou získal doktorand cenné a úplné informace o složení jednotlivých skupin lipidů. Výsledky své práce publikoval ve velmi dobrých mezinárodních časopisech, což je samo o sobě známkou úspěšného splnění zadání disertační práce.

Je poněkud škoda, že každá z dílčích otázek, představovaná jednotlivými články, byla řešena na jiném a příbuzensky vzdáleném druhu hmyzu. Vyvolává to dojem poněkud nesourodého souboru výsledků, které byly uměle spojeny za účelem disertace, i když je spojuje jednotná metodika. Vynaložená práce, jejíž objem je zřejmý a úctyhodný, by byla mnohem lépe zhodnocena, kdyby se doktorand zaměřil na jeden modelový druh, u něhož by byly otázky řešeny více do hloubky.

Musím také konstatovat, že předložená disertace je málo přehledná a špatně čitelná. Osobně jsem též příznivcem formy souboru separátů spojených úvodem a souhrnem (nač opisovat či dokonce překládat články, které prošly mezinárodní, mnohdy tvrdou recenzí?). V disertaci se však střídají rozsáhlé úvodní partie s podanými rukopisy či separáty: za str. 32 následuje str. 1 (vloženého rukopisu), za str. 23 jde str. 33 a dále za str. 49 opět str. 1. Tento systém ztěžuje orientaci v disertační práci a zhoršuje její čitelnost. Postrádám diskusi vlastních výsledků, speciálně u prací 2 a 3. Bylo by lépe zařadit separáty a podané rukopisy až na konec disertační práce a v souhrnné části problematiku uvést a shrnout výsledky.

Konkrétní dotazy a připomínky k práci uvádím v následujícím přehledu:

1. Str. 5: Názvy mastných kyselin jsou zkracovány nekonsistentním způsobem: C 16:0, ale 18:0. Zkratky by měly být jednotné.
2. Otázka k metodě uchovávání vzorku před zpracováním: Byl přidáván nějaký antioxidant (např. BHT, 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylfenol) ke vzorkům, aby se zabránilo oxidaci lipidů před zpracováním vzorku?
3. Str. 10: U citací článků zabývajících se analýzami nepolárních lipidů by bylo více relevantní odkazovat na práce Kofroňová et al., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009** nebo Kofroňová et al., *J. Chromatogr. B* **2009** než na článek Cvačka et al., *Lipids* **2008**. Je též překvapivé, že v této souvislosti nejsou citovány práce z týmu prof. Holčapka, který studuje LC-MS triacylglycerolů (byť rostlinných) systematicky již delší dobu.

4. Str. 16: Pro rychlé analýzy se v lipidomických studiích používá též MALDI technika. Nezvažovali jste ji vyzkoušet pro vzorky celkových hmyzích extraktů?
5. Proč není tabulka v příloze 7 (str. 70) zahrnuta do publikace a ani není diskutována v příslušné části disertace?
6. Stejná otázka se týká i tabulky na str. 71. Bylo její obsah vyřazen z publikace při recenzním řízení, nebo jde o „supplementary material“?
7. Řada obrázků v disertaci je zjevně odněkud převzata, ne vždy je citován zdroj. Měl doktorand souhlas k reprodukci obrázků? Upozorňuji v této souvislosti na autorská práva.

Upozornění na formální chyby v práci:

- a) Str. 5: eicosanoic se podle nového názvosloví změnilo na icosanoic.
- b) Str. 5: překlep „polysaturated“, je míněno „polyunsaturated“.
- c) Str. 35: odkaz na Fig. 25 má být Fig. 24.
- d) U řady citací chybí rok publikace: Blight & Dyer, Cheng & Gross, Harwood et al., Huang et al., Malone & Evans.
- e) Některé citace zůstaly neupraveny zřejmě po přetažení z databáze - příklad Harwood et al., Huang et al., Dowhan & Bogdanov - je součástí bibliografického „anonymous“, což tam zjevně nepatří.

Závěrem bych chtěla říci, že uvedené dotazy a připomínky nejsou zásadního charakteru a nikterak nesnižují úroveň předložené práce. Celkově hodnotím práci jako velmi dobrou a doporučuji ji k obhajobě.



V Praze dne 2. prosince 2009

Doc. RNDr. Irena Valterová, CSc.