

Oponentský posudek doktorské disertační práce
Ing. Ivany Schneedorferové
Jihočeská univerzita
Přírodovědecká fakulta

Optimalizace a aplikace chromatografických a hmotnostně spektrometrických metod ke stanovení lipidomu v otázkách fyziologických, nutričních a biochemických

Rozsah práce

Předložená disertační práce je vypracována v krátkém pojetí 23 stran doplněná o kopie publikovaných článků. Vlastní text se skládá z úvodu, kombinace teoretické části a metodiky, definice cílů a komentáře k publikacím. Dle mého názoru je to velmi krátký a víceméně popisný text, který postrádá vlastní vklad doktorandky z pohledu kritického zhodnocení možností, výsledků a diskuze.

Ing. Schneedorferová je první autorkou jednoho článku, a dále spoluautorkou tří publikací. Podíl doktorandky na výsledcích v jednotlivých publikacích je odvoditelný z obsahu disertační práce a také přímo definován autorkou i školitelem. Celá práce je psána anglicky a její úprava vyhovuje obecným formálním požadavkům kladeným na disertační práci. U přiložených prací postrádám přílohy (Supplementary information).

Obsah

Úvodní část předložené disertační práce je věnována literárnímu přehledu o současném stavu řešené problematiky. Podrobně jsou popsány současné poznatky v lipidomice, chromatografii i hmotnostní spektrometrii, ale není představena biologická podstata práce. Také cíle práce jsou definovány zcela obecně. Bylo by vhodné vysvětlit, proč byly prováděny jednotlivé optimalizace metod, proč bylo studováno tukové těleso hmyzu a ne třeba trávící trakt, jak to souvisí se smažením či pečením ryb, glykolipidy v mozkových řasách atd.

Hlavním cílem práce byla charakterizace lipidů v několika různých matricích. Za tímto účelem předkladatelka optimalizovala extrakci lipidů z hmyzu, řas a ryb, separační metody pro lipidové třídy i podtřídy, testovala různé kombinace LC-MS a GC-MS, a na konec charakterizovala jednotlivé molekuly. Práce netestuje žádnou specifickou vědeckou hypotézu a věnuje se čistě analytickému rozboru identifikovaných lipidových tříd a aplikacím metodiky.

Výsledky jsou bohužel opět jen popsány a chybí mi vlastní kritická interpretace dat. Všechny výsledky již však byly publikovány v časopisech.

Otázky

- 1) Čl. 1 – Fosfolipidy jsou anotované pomocí lomítka – odpovídá tedy anotace *sn* pozici? Jakým způsobem jste určovala *sn1* a *2* pozici acylu? V tabulce jsou také ESI+ a ESI- majoritní (?) ionty – využívala jste obě formy ke kvantifikaci a nebo z jakého důvodu jsou v tabulce prezentovány?
- 2) Čl. 1 – jak si vysvětlujete přítomnost pouhých 14 PC a PE? Má to nějaký vztah k potravě a nebo k enzymatickému aparátu tohoto hmyzu?
- 3) Čl. 2 – Jakým způsobem byl vytvořen obrázek 3? Jak byla přepočítána data z režimu ESI+ fosfolipidů na složení mastných kyselin? Na základě jaký iontů a jakých fragmentů byla provedena tato anotace a kvantifikace?

- 4) Čl. 2 - Dle mého názoru není možné pomocí v metodice popsané techniky získat anotace tak, jak jsou uvedeny v příloze publikace. Jak jste pomocí ESI+ MS/MS identifikovala například PE 22:6/16:1 a nebo TG 16:1/16:0/2:0? Ač v předchozím článku používáte nezávislé stanovení fosforu na korekci MS signálu mezi fosfolipidy, zde tomu tak učiněno nebylo?
- 5) Čl. 2 - Jak si vysvětlujete, že ve vzorku Cod, grilled, byla pro molekulu TG 18:1/18:0/4:0 nalezena relativní koncentrace 17.53 procenta? Jedná se o degradační produkt vlivem tepelné úpravy? Sledovala jste i některé jiné degradační produkty lipidů?
- 6) Čl. 2, obr.5 - Pokud rozumím správně protokolu, ryba byla na pánvi upravena na oleji a následně byl odebrán vzorek pro GC-MS. Vzorek byl tedy zpracován včetně oleje nasáklého ve vzorku, a tedy byl po transesterifikaci „obohacen“ o komponenty olivového oleje, čímž se procentuální zastoupení původních FAME snížilo. Nerozumím tedy vašemu závěru o relativním poklesu n-3 a n-6 FAME v těchto vzorcích. Jak jste prosím korigovala profil na množství a kompozici oleje?
- 7) Čl. 3 – Zde bohužel není rozepsaná metodika pro lipidomiku. Můžete ji prosím představit? Například Obr. 2A – jak byly definovány triacylglyceroly a fosfolipidy a jak byla provedena kvantifikace a normalizace?
- 8) Čl. 4 – Můžete prosím vysvětlit vícerozměrnou statistiku a její aplikaci na data?

Závěr:

Předložená práce řeší problematiku identifikace a kvantifikace lipidů z říše hmyzu a řas pomocí metod analytické chemie. Studie byly provedeny na pracovištích Parazitologického ústavu AV ČR a Jihočeské univerzity. Cíle práce byly ve své obecnosti splněny, zahrnuté publikace a výsledky dokazují, že předkladatelka je seznámena s problematikou v dané oblasti a disertační práci doporučuji přijmout k obhajobě.

V Praze dne 15. dubna 2019



RNDr. Ondřej Kuda, PhD
Fyziologický ústav AV ČR v.v.i.
Metabolismus bioaktivních lipidů
Videňská 1083
142 20 Praha 4



Posudek oponenta na disertační práci Ing. Ivany Schneedorferové

„Optimization and Application of Chromatographic and Mass Spectrometric Methods for Determination of Lipidome in Physiological, Nutritional and Biochemical Issues“

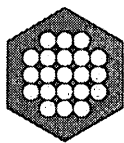
Doktorská disertační práce Ing. Ivany Schneedorferové vznikla v rámci spolupráce Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích a Biologického centra AV ČR pod vedením RNDr. Aleše Tomčaly, Ph.D. Práce se zabývá stanovením lipidů a mastných kyselin v biologických vzorcích pomocí moderních separačních metod, zejména vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem. Téma práce je interdisciplinární a vysoce perspektivní, přínosné pro vědeckou komunitu i pro uživatele z praxe. Výsledky práce byly opublikovány formou 4 článků v prestižních mezinárodních časopisech s impaktním faktorem. V první části své práce se autorka věnuje stanovení fosfolipidů ve vzorcích ruměnice pospolné za využití jednodušších, ale robustních a spolehlivých analytických metod charakterizovaných nízkými provozními náklady; jde zejména o spojení extrakce tuhou fází a vysokoúčinné tenkovrstvé chromatografie. Následuje studie zaměřená na testování vlivu tepelné úpravy na poměr ω -3/ ω -6 a obsah polynenasycených mastných kyselin ve vzorcích 4 druhů ryb. Tato část práce je velice zajímavá a aktuální s ohledem na potravinářské aspekty i dnes hojně diskutovaný životní styl zahrnující stravovací návyky typické pro obyvatele evropských zemí. Závěrečné dvě studie jsou potom věnovány problematice lipidomu v souvislosti s imunitní odpovědí živého organismu a separaci a identifikaci lipidů u dvou druhů řas. Předložená práce je svým obsahem hodnotná, což potvrzuje skutečnost, že její jednotlivé části úspěšně prošly náročnými recenzními řízeními v redakcích odborných časopisů. Autorka se zdárně vypořádala se všemi aspekty práce na výzkumném projektu, význam disertace pro rozvoj vědního oboru je nesporný. Veškeré výsledky byly získány za využití špičkové analytické instrumentace. Bohatá publikační aktivita Ing. Ivany Schneedorferové je příslibem pro její další působení na akademickém pracovišti. Niže uvedené dotazy a připomínky jsou projevem mého zájmu o téma práce a nikterak nesnižují její vysokou kvalitu ani odbornou úroveň.

- U obrázků č. 7, 8, 9, 10 a 11 se neshodují čísla uvedená pod obrázky s odkazy v textu.
- Těžiště předložené práce spočívá ve využití metod HPLC-MS-MS. Diskutujte, proč jste upřednostnila toto spojení před GC-MS. Plynová chromatografie bývá hojně využívána jako metoda vhodná pro stanovení mastných kyselin. Uvažovala jste též o využití superkritické fluidní chromatografie? Porovnejte možnosti, přednosti a omezení uvedených chromatografických metod při analýzách lipidů.
- Popište možnosti využití navržených metod a dané instrumentace v medicíně, například při stanovení krevních lipidů.

Závěrem mohu konstatovat, že předložená práce splňuje veškeré požadavky kladené na doktorské disertační práce, doporučuji ji proto k obhájení a paní Ing. Ivaně Schneedorferové navrhuji udělit titul „doktor“ uváděný ve zkratce „Ph.D.“.

V Českých Budějovicích dne 4. dubna 2019

doc. RNDr. Jan Šíma, Ph.D.



ÚOCHB ^{AV}_{ČR}
IOCB PRAGUE

RNDr. Vladimír Vrkoslav Ph.D.

UOCHB AV ČR, v.v.i.

Hmotnostní spektrometrie

Flemingovo nám. 2

166 10 Praha 6

Věc: Posudek oponenta disertační práce

Jméno a příjmení uchazeče: **Ing. Ivana Schneedorferová**

Název práce: **Optimization and Application of Chromatographic and Mass Spectrometric Methods for Determination of Lipidome in Physiological, Nutritional and Biochemical Issues**

Disertační práce **Ing. Ivany Schneedorferové** se zabývá aplikací analytických metod pro kompletní charakterizaci lipidů v různých biologických vzorcích. Těžiště této práce spočívá ve studiu a použití HPLC/MS-MS pro analýzu intaktních molekul polárních i neutrálních lipidů v jedné analýze. Dále bylo při přípravě vzorků a analýze lipidů využito technik extrakce na pevné fázi, tenkovrstvé chromatografie a techniky derivatizace vzorku (konkrétně transesterifikace). Profilování mastných kyselin bylo prováděno plynovou chromatografií (GC). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí dostupných programů. Metody byly aplikovány pro analýzu lipidomu ryb, hmyzu a jednobuněčných organismů.

Disertační práce je psána anglicky s využitím publikovaných prací autorky. Autorka v práci prezentuje čtyři odborné články publikované ve kvalitních odborných impaktovaných časopisech. V úvodní části je krátce popsána teorie a jsou zde shrnuty poznatky související s experimentálními postupy. Po uvedení cílů navazuje část shrnující dosažené poznatky, závěr a soupis použité literatury. V následující části jsou chronologicky řazeny čtyři publikace z nichž u jedné je Ing. I. Schneedorferová uvedena jako první autor.

První práce se zabývá analytickými přístupy použitelnými pro analýzu fosfolipidů v těle organismů (Journal of Separation Science, 37: 2062-2068). Navržený analytický postup byl aplikován na studium změny složení fosfolipidů ploštice *Pyrrhocoris apterus* vlivem teplotních změn prostředí.

Druhý článek se věnuje problematice výživy (Food Chemistry, 176: 205-211). Článek považuji za nejdůležitější z uvedených publikací vzhledem k příspěvku autorky. Ing. I. Schneedorferová je první autorkou tohoto článku a podílela na něm od přípravy vzorku až po jeho sepisování. Práce se zaměřuje na analýzu obsahu vícenenasycených mastných kyselin a poměru n-3/n-6 nenasycených mastných kyselin ve vzorcích rybiho masa z různých druhů ryb. Dále je zde popisován vliv způsobů tepelné úpravy masa na změnu poměru nenasycených mastných kyselin. Článek byl publikován ve velice kvalitním časopise zabývajícím se výživou. Třetí článek popisuje změnu metabolismu vlivem imunitní odezvy na přítomnost parazitoida (PLoS biology, 13.). Součástí práce je studium změn koncentrace lipidů. Autorka přispěla velmi výrazně svojí prací také do poslední zařazené publikace (Journal of Separation Science, 40: 3402–3413). Publikace demonstruje využití HPLC-(ESI)-MS² pro charakterizaci lipidů jednobuněčných organismů v jedné analýze.

Grafická úroveň práce vyhovuje standardům vyžadovaným u disertačních prací. Jednotlivé části svým charakterem odpovídají požadavkům kladeným na disertační práce. V úvodu bych uvítal podrobnější popis některých principů a podrobnější popis obrázků. Přílišná stručnost znesnadňuje pochopení textu a obrázků. Například obrázek v kapitole 1.2.2.2 není díky příliš stručnému popisu dobře pochopitelný. Kapitola 1.2.3 “Derivatization” zahrnuje pouze jeden typ derivatizačních reakcí – transesterifikace. Formálním nedostatkem je také chyba v číslování několika obrázků (na straně 8 a na následujících stránkách).

Autorka musela nastudovat celou řadou publikací, čemuž odpovídá i počet citací odborných literárních zdrojů. Pro splnění zadaných cílů se autorka musela detailně seznámit s instrumentací, s postupy přípravy vzorků pro HPLC a GC a s interpretací dat získaných pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Důležitou součástí práce bylo také statistické vyhodnocování dat. Uvedenými postupy autorka získala zajímavé výsledky, které se staly součástí publikací uveřejněných v impaktovaných časopisech. Všechna zmíněná fakta hodnotím kladně. Odborné vědecké články prošly recenzním řízením v impaktovaných časopisech a žádné výrazné nedostatky nemají.

Výše zmíněné formální nedostatky mi nebrání disertační práci Ing. Ivany Schneedorferové doporučit k obhajobě.

Dotazy k obhajobě:

1. Prosím o objasnění obrázku v úvodu na straně 11 včetně odkazů, které se ho týkají. (Patrně obrázek č. 9.)
2. Korelace mezi procentuálním poměrem zastoupení methylesterů získaných GC-FID a HPLC-ESI-MS je popsána v článku I. a využita dále v článku IV. Třídy lipidů analyzované v publikaci I. a v publikaci IV. se liší. Funguje tato korelace napříč všemi třídami lipidů?
3. Dotaz na obrázky v Supp. Inf. článku IV (strana 100 -101):
 - a. Obrázek 8. a 9A. obsahují stejná data?
 - b. Data pořízená HPLC (Supp. Fig. 9.B) vychází z jedné analýzy? (Nejsou zde chybové úsečky.)
4. Před příchodem HPLC-MS se pro profilování mastných kyselin etablovala technika GC-FID a GC-MS. V mnoha člancích zabývajících se HPLC-MS lipidů se měří profil mastných kyselin i technikou GC, podobně jako ve vašich pracích. Většinou data dobře korelují. Lze podle vašeho názoru nahradit GC analýzu analýzou HPLC intaktních lipidů?

Datum vypracování posudku: **12.4. 2019**

Jméno a příjmení, podpis oponenta: **RNDr. Vladimír Vrkoslav Ph.D.**

