

Oponentský posudek na doktorskou práci

RNDr. Richarda Vitáska

Téma : **Imunochemické detekce tkáňového poškození**

Doktorská práce RNDr. Vitáska je velmi dobře koncipována s hlediska experimentálního i možností využití v klinické medicíně. Z tohoto aspektu je příkladná a naznačující směr, kterým by se doktorské práce vznikající na lékařských fakultách měly vyvíjet.

Cílem práce bylo vybrat spolehlivé a poměrně dobře v klinice využitelné znaky tkáňového poškození, vznikající na podkladě vzniku volných radikálů a jejich reaktivních produktů. Ke studiu tkáňového poškození byly vybrány dva markery. Jako znak počátečního poškození tkáně reaktivními sloučeninami byl vybrán 3-nitrotyrosin jako stabilní produkt působení kyseliny peroxydusité. Druhým vybraným markerem byl glykoprotein COMP (cartilage oligomeric matrix protein) – označovaný jako trombospondin-5, jako znak pokročilé fáze tkáňového poškození, jmenovitě chrupavky.

První fáze experimentální práce byla zaměřena na výběr spolehlivých metodik, vhodných i pro případné rutinní použití v klinice. Pro marker 3-nitrotyrosin byla připravena vlastní monoklonální protilátka s vyšší afinitou než u protilátky dostupné komerčně a poté vyvinuta citlivá a jednoduchá metoda, kterou bylo možné stanovit 3-nitrotyrosin v dostatečně ředěných sérech a tkáňových extraktech při koncentraci bílkovin pod 1 mg/ml.

Pro pokročilou fázi tkáňové destrukce, konkrétně chrupavky, byly připraveny vlastní monoklonální protilátky proti různým epitopům COMP, jejich rozřídění a výběr takových, které by umožnily měřit hladinu COMP v tělních tekutinách inhibiční a sendvičovou metodou.

K ověření testů a metodik vhodných pro detekci 3-nitrotyrosinu byly provedeny pokusy na potkaních modelech (experimentálně indukovaná pneumonie za podmínek normoxie a hyperoxie), erytrofagocytózy makrofágové linie RAW 264.7 myši, membrány lidských erytrocytů jak intaktních, tak po 24 hodinové peroxidaci a konečně i sledování koncentrace 3-nitrotyrosinu v buněčných bílkovinách jak rozpustných, tak nerozpustných během stárnutí modelových vyšších rostlin (*Nicotiana*) a kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*).

Při studiu významu COMP pro klinickou využitelnost byla zkoumána vazba monoklonálních protilátek proti kryptickým fragmentům a porovnáním se známou primární strukturou COMP bylo zjištěno, že každá z testovaných protilátek se váže na jinou doménu v jeho podjednotce. Protože bylo zjištěno, že mezi zkoumanými monoklonálními protilátkami neexistuje sférická kompetice, byla vyvinuta sendvičová imunoesej. Na základě takto vypracované metody bylo možné určit základní údaje týkající se hladiny COMP v séru i synoviální tekutině lidí za fyziologických i patologických stavů (revmatoidní artritida, osteoartróza).

Autor doktorské dizertační práce prokázal, že se hladina 3-nitrotyrosinu v séru během 4 denní hypoxie signifikantně zvyšuje, ale hyperoxie u zdravých potkanů nemění hladinu ani obsah 3-nitrotyrosinu v plicní tkáni. Za patologických podmínek (experimentálně indukovanou pneumonie) brání hyperoxie zvyšování koncentrace 3-nitrotyrosinu v séru i plicní tkáni a dokonce hladinu tohoto markeru tkáňového poškození v séru snižuje. Toto pozorování je významné i s hlediska medicínského a naznačuje význam oxygenoterapie nemocných nejen z důvodů chronické plicní insuficience, ale i v akutní stavech, zejména u těžkých plicních zánětů.

Pozoruhodné je i zjištění, že při fagocytóze erytrocytů makrofágovou linií bylo stanovení 3-nitrotyrosinu jedním z důkazů, že respirační vzplanutí je blokováno jejími membránami, nikoli obsahem. Při studiu 3-nitrotyrosinu na modelu stárnutí vyšších rostlin a kvasinek

disertant prokázal, že přítomnost 3-nitrotyrosinu úzce souvisí s procesem stárnutí (při poškození reaktivními dusíkovými sloučeninami) a zjištění, že na stárnutí kvasinek se podílí reaktivní sloučeniny dusíku je prioritním zjištěním. Oceněnihodný je i výsledek práce týkající se využití inhibiční a sendvičové EIA pro určování diferencially diagnostických a prognostických markerů, konkrétně hladin COMP v séru i synoviální tekutině u různých artralgií a artropatií.

Doktorská práce RNDr Vytáška je velmi precizně zpracována, po formální stránce zcela vyhovuje, obsahem je podnětná a obsahuje řadu původních metodických i experimentálních výsledků. Je doplněna osmi přílohami odpublikovaných studií v renomovaných časopisech, které dokumentují akceptovatelnost vědeckých výsledků.

Zajímalo by mne, zda vyšetření 3-nitrotyrosinu v séru by bylo možné využít při transplantacích orgánů jako jednoho z markerů možného odhojování ?

V jakých klinických situacích se dá uplatnit vyšetřování 3-nitrotyrosinu ?

Je možné vyšetření 3-nitrotyrosinu využít i jako markeru nedostatečného oxidativního vzplanutí při bakteriálních infekcích ?

K práci nemám žádné připomínky. Domnívám se, že využitelnost metodik v předložené doktorské práci je mimořádně cenná pro klinickou praxi a přináší i podněty k dalším studiím experimentálním i klinickým.

Doktorskou práci RNDr. Richarda Vytáška považuji za velmi kvalitní, odpovídající požadavkům na udělení titulu Ph.D. a komisi ji s tímto posudkem doporučuji.

V Praze 21.8.2006

prof. MUDr. Terezie Fučíková, DrSc