

Oponentský posudek disertační práce

Autorka disertační práce: ing. Kateřina Dunovská

Školitelka: ing. Eva Klapková, Ph.D.

Název disertační práce: Biochemie a patobiochemie fylochinonu a menachinonů

Posudek vypracovala: doc. MUDr. Alice Skoumalová, Ph.D.

Předložená disertační práce má celkem 147 stran, je napsána v českém jazyce a rozčleněna tradičně do kapitol s úvodem a teoretickou částí (48 stran), cíly, experimentální částí (9 stran), výsledky s diskuzí (50 stran) a závěry. Disertační práce obsahuje seznam zkratk, 39 obrázků, 36 tabulek a 1 přílohu se sekvencí aminokyselin vitamin K dependentních proteinů. Autorka ve své práci cituje 165 odborných publikací. Také je přiložen seznam publikací autorky souvisejících s disertační prací včetně 3 publikací v časopisech s IF (v jednom je autorka uvedena na prvním místě) a 6 publikací v časopisech bez IF. Následuje seznam publikací autorky nesouvisejících s disertační prací. Práce byla vypracována na Ústavu lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol pod vedením školitelky ing. Evy Klapkové, Ph.D.

Práce je zaměřena na problematiku metodiky stanovování vitaminu K₁ a dvou vitaminů K₂ (menachinonu-4 a menachinonu-7) včetně srovnání dvou různých metod měření, zjištění referenčního rozmezí těchto vitaminů ve stredo-evropské populaci a klinických aspektů stanovování hladin vitaminů K u některých skupin pacientů včetně srovnání přímých a nepřímých metod.

V teoretické části podává autorka velice hezký přehled biochemie a metabolismu jednotlivých vitaminů K a také klinických aspektů jejich nedostatku a nadbytku. Dále se věnuje podrobnému přehledu vitamin K dependentních proteinů a jejich roli v metabolismu, případně u různých onemocnění. V závěru experimentální části jsou popsány metody měření vitaminu K. Do textu jsou zařazeny přehledné tabulky shrnující danou problematiku (např. funkce vitamin K dependentních proteinů, přímé a nepřímé metody stanovení vitaminu K a další).

V experimentální části je přehled materiálů a přístrojů použitých v rámci disertační práce a metodika přípravy reagensů pro HPLC a LC-MS/MS. Podrobnější popis obou metod stanovení vitamínů K je již součástí výsledků. V rámci výsledků se autorka nejdříve zaměřuje na vyvinutí a validaci stanovení vitamínu K metodou HPLC a LC-MS/MS. Validace obsahuje důležité výstupy včetně opakovatelnosti, reprodukovatelnosti a „bias“ měření, dále stanovení meze detekce a meze kvantifikace, výtěžnost a robustnost dané metody. V dalších kapitolách autorka uvádí výsledky stanovení vitamínu K pomocí HPLC s fluorescenční detekcí u pacientů s osteoporózou. Na to navazuje využití metody LC-MS/MS detekce vitamínu K v rámci různých skupin subjektů (pacienti s osteoporózou, zdraví jedinci bez osteoporózy, zdraví dobrovolníci pro stanovení referenčního rozmezí, pacienti s osteopénií a pacienti s cystickou fibrózou). Dále autorka prezentuje výsledky přímého a nepřímého měření vitamínu K u pacientů a dobrovolníků užívajících vitamin K (menachinon-7). Toto je doplněno hodnocením stavu kvality kostní hmoty pomocí denzitometrického vyšetření. Také na skupině pacientů s cystickou fibrózou autorka srovnává použití přímých a nepřímých metod detekce hladin vitamínu K v organismu. Na závěr jsou srovnány obě přímé metody měření vitamínů K (HPLC a LC-MS/MS).

V rámci hodnocení disertační práce bych chtěla vyzdvihnout přehlednou teoretickou část s již zmíněnými souhrnnými tabulkami, které umožňují rychlou orientaci v problematice. Dále oceňuji výsledky vyvinutí dvou metod přímého stanovení hladin vitamínu K obsahující důležité kroky nezbytné pro jejich validaci, jejich srovnání a další využití v experimentální práci. Ve své práci autorka také určuje referenční rozmezí pro vitaminy K ve středoevropské populaci, což je velice přínosné vzhledem k tomu, že jeho množství je ovlivněno složením stravy, které se v rámci světové populace liší. Dále pozitivně hodnotím srovnání a diskuzi ohledně využití přímých a nepřímých metod stanovení hladin vitamínu K v organismu.

Autorce bych naopak vytkla způsob nadefinování cílů práce, které působí trochu neuceleně a u některých není na první pohled jasné, proč si je vybrala. Některé z dílčích cílů jsou spíše způsob, jak se k cíli dostat (dle mého názoru je např. jedním z důležitých cílů práce srovnání přímých a nepřímých metod stanovení hladin vitamínu K v organismu, což v cílech není definováno, naopak stanovení různých parametrů u různých skupin subjektů je spíše způsob provedení, jak se k cíli dostat).

Závěrem lze shrnout, že disertační práce je zaměřena na vyvinutí a porovnání dvou metod přímého stanovení vitamínu K a jejich využití v rámci různých klinických situací, u kterých je porušen metabolismus vitamínu K či vitamin K dependentních proteinů. Autorka svými výsledky přispívá do problematiky přímého a nepřímého stanovení vitamínu K u různých patologických stavů. Autorka demonstruje schopnost samostatné vědecké práce včetně využití různých vědeckých metod, vyhodnocení a srovnání výsledků i kritického myšlení.

Dle výše uvedených skutečností doporučuji, aby byl ing. Kateřině Dunovské na základě úspěšné obhajoby disertační doktorské práce udělen titul Ph.D.

Otázky k obhajobě:

1. V disertační práci je provedena validace metody měření vitamínu K pomocí HPLC a konstatováno, že jiné odborné práce zabývající se stejným typem použité metody a stanovení těchto forem vitamínu K nedosahují takových validačních parametrů jako autorka. Proč se to autorce podařilo lépe? Co udělala jinak?

2. U jakých klinických stavů a nemocí by mělo být zavedeno stanovení vitamínu K rutinně a proč? Jaké jsou úskalí?