

Oponentský posudek disertační práce ing. Jiřího Kukačky
"Identifikace a stanovení metaloproteinů a metaloproteináz
v experimentálních modelech a v souborech pacientů"

Předložená disertační práce má 150 stran, 15 tabulek, 12 grafů, 17 obrázků a 317 recentních citací. V příloze je citováno 9 prací v časopisech s impakt faktorem (Electrochimica Acta IF = 2,995, atd.), 13 prací v recenzovaných časopisech, dále jsou uvedeny abstrakta, přehled přednášek a posterových sdělení z českých a mezinárodních konferencí.

Přeložená disertační práce byla vypracována na Ústavu klinické biochemie a patobiochemie, Ústavu lékařské chemie a biochemie a Ústavu fyziologie 2. LF UK v Praze ve spolupráci s Univerzitou v Oulu.

Předložená práce je uceleným dílem, které je přehledně členěno. V úvodní části disertant popisuje vlastnosti metaloproteinů a soustředí se na proteiny obsahující ve své molekule zinek. Hlavní pozornost je věnována matrixovým metaloproteinázám, jejich klasifikaci, substrátové specifitě a jejich vztahu k myokardu. Je popsán vliv MMP při ischemickém poškození myokardu a též při aterosklerotických změnách cév. Jsou uvedeny současné možnosti využití MMP v klinicko-biochemické praxi.

V závěru úvodní části je stručně zmíněna molekula metalothioneinu a jeho biologické funkce. Bylo by vhodné popsat strukturu této molekuly a uvést jeho základní biochemické charakteristiky

Cíle práce jsou formulovány přesně – analýza MMP a sledování změn srdečního svalu u potkana ve dvou stavech – krátkodobá a dlouhodobá hypoxie a podání metamfetaminu, zavedení metodiky pro identifikaci MMP a metalothioneinu v biologických materiálech a jejich stanovení u dvou skupin pacientů – dyslipidémie a traumatické poškození mozku.

V metodické části disertant popisuje experimentální modely hypoxie - podání inhibitoru batimastat a amfetaminu. Jsou charakterizovány oba soubory pacientů (dyslipidémie a traumatické poškození mozku). V části laboratorní metody jsou podrobně popsány analytické postupy, které jsou v práci použity – izolace srdečních proteinů, stanovení 4-hydroxyprolinu, elektroforéza kolagenních proteinů, hybridizace mRNA, zymografie matrixových metaloproteináz, kvantitativní stanovení MMP-3, MMP-9 a MMP-2, elektrochemické stanovení metalothioneinu. Jsou použity adekvátní statistické metody.

Stěžejní část práce jsou výsledky a diskuse, kdy autor kriticky hodnotí své výsledky v kontextu současných znalostí.

Nejprve jsou popsány změny relativní hmotnosti srdce u čtyřdenní hypoxie a změny složení koncentrace nerozpustných a rozpustných kolagenních proteinů v pravé a levé komoře srdeční včetně změn koncentrace hydroxyprolinu v komorách srdečních. Dochází ke změnám aktivity srdečních MMP a mRNA pro prokolagen. Dále jsou uvedeny změny při dlouhodobé hypoxii a podání inhibitoru MMP batimastatu. Hypoxie zvýšila aktivitu MMP 2 a MMP-9, při podání batimastatu naopak jejich aktivita je snížena až vymizelá. Metamfetamin změnil kvantitativní složení proteinů pouze v levé komoře a zvýšil koncentraci metalothioneinu v séru. Disertant popsal podíl matrixových metaloproteináz na remodelaci srdečního svalu v různých experimentálních podmínkách.

U dyslipidemických pacientů disertant našel vyšší koncentraci MMP-9, která při terapii hypolipidemiky se snížila a uvádí, že MMP-9 může sloužit jako marker úspěšnosti hyperlipidemické léčby.

Pacienti s poškozením mozku mají zvýšenou koncentraci metalothioneinu, což může souviset s jeho neuroprotektivním působením. V textu je překlep na str. 97, kde má být uvedeno „u skupiny I“ nikoliv II. MMP2 a MMP9 jsou zvýšeny na počátku hospitalizace více u pacientů se závažnějším postižením později bez rozdílu

Disertant popisuje velmi vysoké hodnoty MMP u difuzního axonálního poranění mozku, avšak tato podskupina má jen tři pacienty a bude zajímavé sledovat tyto změny na větším souboru.

Pro stanovení významu MMP a metalothioneinu v klinické praxi bude nutné provést další vyšetření navazující na práci disertanta, který naznačil možné využití v lékařské praxi.

K dizertantu mám následující dotazy či komentáře:

1/ Jaké proteiny se skrývají pod označením metabolické proteiny, kontraktilní proteiny, rozpustné a nerozpustné proteiny ECM ?

2/ Jak si vysvětlujete, že metamafetamin vedl ke změnám jen u levé komory srdeční?

3/ Jaká je možná dostupnost a rychlost vyšetření MMP a metalothioneinu v klinicko-biochemické diagnostice ?

4/ V tabulce 3 popisující MMP při patologických a fyziologických procesech by bylo vhodnější uvést někde přesnější odborné medicínské termíny než rakovina, gastrický vřed apod.

5/ V tabulce 12 je uveden signifikantní rozdíl mezi skupinami. Jedná se o rozdíl od kontrol nebo od hodnot před léčbou hypolipidemiky ?

6/ Sledovali jste vztah MMP při léčbě dyslipidemických pacientů s dalšími rizikovými faktory aterosklerózy jako CRP(event. hs CRP), urikémie, glykémie ?

Závěrem lze hodnotit, že dizertace se zabývá aktuální problematikou základního a aplikovaného výzkumu se vztahem ke klinické medicíně jako je studium změn extracelulární matrix a metaloproteináz.

Na práci vysoce hodnotím zvládnutí nejen celé širší laboratorních technik, ale též zvládnutí problematiky experimentální i klinické studie. Práce přinesla prioritní poznání a její části byly publikovány v časopisech s impakt faktorem.

Na základě výše uvedených skutečností lze konstatovat, že ing. Jiří Kukačka prokázal schopnost samostatné vědecké práce. Doporučuji proto, aby na základě úspěšné obhajoby doktorandské disertační práce mu byl udělen titul PhD.

Praha, 14. ledna 2008

Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.
přednosta Ústavu klinické biochemie
a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN
Praha