

Oponentský posudek disertační práce Ing. Terezy Fenclové

„Přirozené inhibitory koagulačních faktorů, jejich úloha v prevenci trombózy a v procesech imunitní odpovědi, angiogeneze a karcinogeneze“

Předkládaná disertační práce Ing. Terezy Fenclové se zabývá z klinického pohledu velmi zajímavým tématem – studiem inhibitorů koagulačních faktorů, primárně proteinu S. Problematika koagulace, její průběh, regulace a inhibice je velmi složitá, vztahy mezi jednotlivými účastníky koagulačních procesů ovlivňuje nespočet dalších faktorů a mnohé v této oblasti je doposud málo probádané. Mezi ty méně probádané patří také protein S, jímž se disertační práce primárně zabývá. Téma je z mého pohledu aktuální a použité metody jako molekulárně genetické, tak biochemické jsou adekvátní prováděnému výzkumu. Disertační práce má jasně stanovené cíle, které byly splněny. Ne úplně jasně jsou formulovány vědecké hypotézy, což však nijak nesnižuje kvalitu předkládané disertační práce, neb jedním z cílů doktorského studia je naučit se vědecké hypotézy vytvářet a potvrzovat či vyvracet.

Ing. Fenclová se soustředila na splnění nadefinovaných cílů. Pomocí metod molekulárně genetických (Sangerovo sekvenování, MLPA) analyzovala vzorky DNA vybraných pacientů a našla u nich kauzální mutace v genu *PROS1* - 34 různých mutací, z nichž 15 nebylo dosud popsáno a u tří pacientů byla nalezena metodou MLPA delece. Disertantka všechny nové mutace podrobila analýze pomocí predikčních sw pro zjištění potenciální patogenity – i přes velký rozvoj AI v poslední době, lze tento nástroj používat pouze jako pomůcku, vždy je nutné sledovat anamnézu a další měřitelné parametry přímo u daného jedince, abychom mohli predikovat, zda některá mutace bude u pacienta způsobovat klinické obtíže. Mezi predikčními sw existují velké rozdíly a u některých mutací je jejich predikční schopnost srovnatelná s hodem kostkou. **Zde bych rád Ing. Fenclové položil první dotaz:** Uvažujete do budoucna provádět podrobnější biochemickou charakterizaci mutantních PS, např. pomocí hmotnostní spektrometrie? V diskuzi se snažíte predikovat chování mutací pouze na základě genetických dat, predikčních sw a klinických projevů, popř. podobnosti s již publikovanými záměnami. Na str. 61 píšete, že: „Mutace p.Ala525Thr vnáší polární hydrofilní zbytek na místo hydrofobního, má tedy potenciál narušit strukturu této oblasti. Vzhledem k velmi nízkým hladinám PS pacienta tato mutace pravděpodobně způsobuje poruchu struktury, která vyústí v degradaci proteinu.“ Toto tvrzení by šlo velmi dobře podpořit či vyvrátit právě pomocí proteomické analýzy v budoucnu.

Disertantka se dále zabývala studiem vlivu polohy mutace v *PROS1* na riziko trombózy. Pomocí multivariantní regresní analýzy bylo prokázáno, že poloha mutací v SHBG-like oblasti (sexuální hormony vázající globulin) PS byla nezávislým rizikovým faktorem pro trombózu, pacienti v SHBG skupině měli také nižší aktivitu proteinu S a trombóza se u těchto pacientů objevovala v mladším věku. Výsledky této studie jsou detailněji uvedeny v publikaci Ing. Fenclové z roku 2023. **Zde mám druhý dotaz na Ing. Fenclovou:** Byly v rámci této studie analyzovány i jiné protrombotické faktory kromě FVL? Jakým způsobem byly další potenciálně protrombotické vlivy vyloučeny?

Disertantka také sledovala vliv aktivní hematologické malignity na aktivitu PS se zjištěním, že nejvyšší zastoupení pacientů s izolovanou patologickou PS aktivitou bylo ve skupině pacientů s akutní myelomonocytickou leukémií (37,5 %). Disertantka v diskuzi také nabízí hypotézu proč tomu tak je, nicméně nijak ji dále nerozvádí (TAM receptory). **Nyní bych si dovolil položit třetí dotaz:** Plánujete do budoucna experimenty potvrzující vaši hypotézu, že snížená aktivita PS ve vaší kohortě pacientů s diagnózou C925 je závislá na aktivitě TAM receptorů? Jak si

vysvětluje, že ne u všech pacientů s diagnózou C925 je snížená aktivita PS, pokud je vaše hypotéza správná?

V poslední části práce se disertantka věnuje studiu vlivu mražení na stabilitu PS při skladování plazmy, což je velmi důležité v preanalytické fázi vyšetření, neboť kvalita vzorku v hemostazeologii je krucální. Byla prokázána dostatečná stabilita všech sledovaných parametrů včetně proteinu S, pokud byly uchovávány alespoň při -80 °C a zmražení probíhalo šokově.

Disertační práce je velmi čtivá, sepsaná srozumitelně, jednotlivé pasáže na sebe logicky navazují. Z formálních výtek bych snad uvedl pouze pár drobných gramatických chyb, např. na str. 36 „V analýze bylo zjištěno, že se mezi danými skupinách onemocnění...“ Z odborného hlediska bych zde zmínil jednu formulační nepřesnost na str. 17: „Vazba endogenních (nebo exogenních) heparinů na vazebné místo heparinu na AT vyvolá konformační změnu, čímž jej „aktivuje“ a urychlí jeho inaktivaci srážecích faktorů 1000 až 4000krát.“ Pojmy srážecí, srážení, sraženina jsou sice hojně mezi lékaři a laiky používány, nicméně z podstaty dějů, které v koagulaci sledujeme, je potřeba se jim vyvarovat – během koagulace nevzniká amorfni sraženina, což pojem srážecí faktor evokuje.

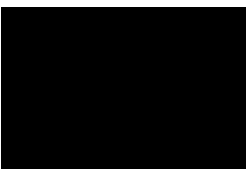
Seznam literatury je velmi pečlivě zpracován. Ing. Fenclová je první autorkou dvou publikací, v nichž prezentuje výsledky svého vědeckého bádání a je tedy zcela zřejmé, že disertační práce přináší původní vědecké výsledky.

Závěrem bych měl ovšem velkou výtku, která není ale primárně směřována k disertantce. Jde o název práce a její následný obsah. Název práce zní: „Přirozené inhibitory koagulačních faktorů, jejich úloha v prevenci trombózy a v procesech imunitní odpovědi, angiogeneze a karcinogeneze“ Čtenář však vidí výsledky pouze pro protein S. V práci nebyla vůbec studována úloha inhibitorů koagulačních faktorů v procesech imunitní odpovědi, angiogeneze a karcinogeneze. Byla studována aktivita PS u aktivních hematologických malignit, nikoliv jeho vliv na karcinogenezi. Tato část práce, avizovaná názvem práce, je pouze teoreticky popsána v teoretické části ve 3 odstavcích. Název práce lze v průběhu studia měnit, proto doporučuji do budoucna, aby byl název práce aktualizován podle toho, jak se doktorské studium vyvíjí a kam disertační práce směřuje. Ani tento nedostatek však dle mého názoru nesnižuje obsahovou kvalitu práce.

Předložená práce posouvá obor hematologie kupředu, jsou zde prezentovány nové výsledky, které doposud žádná jiná skupina zabývající se studiem proteinu S nepublikovala a přináší celosvětově významné výsledky pro další rozvoj vědeckého poznání v hematologii. Výsledky jsou dobře aplikovatelné v praxi – především výsledky studia stability vzorků pro preanalytickou fázi, či sledování hladiny PS u hematologických malignit.

Závěr: Disertační práci Ing. Terezy Fenclové hodnotím jako kvalitní a dle mého názoru práce jednoznačně splňuje požadavky kladené na dizertační práce. Přináší původní vědecké výsledky, které již také byly autorkou publikovány. Disertační práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem. Disertační práci doporučuji k obhajobě.

V Praze, 4. 6. 2023

....


doc. Mgr. Ing. Bc. Roman Kotlín, Ph.D., MHA