

Oponentský posudek dizertační práce

Univerzita: Univerzita Karlova v Praze
Fakulta: 1.lékařská fakulta v Praze
Doktorský studijní program: biomedicína
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Student: Ing. Irena Brabcová
Pracoviště: Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Dizertační práce: Molekulární markery ovlivňující přežití transplantované ledviny a progresi glomerulopatií

Oponent: Doc. MUDr. Ivan Rychlík, CSc., FASN
Pracoviště: II.interní klinika 3.LF UK a FNKV, Praha

Text posudku

Téma dizertační práce je zaměřené na možnosti diagnostiky včasných parametrů progresu chronických glomerulopatií včetně speciální situace – odhojování transplantované ledviny. Cílem práce bylo identifikovat spolehlivé markery rizika progresu renální dysfunkce a potažmo tak přispět k efektivnější léčbě pacienta. Autorka se zaměřila na poměrně novou oblast studia molekulárních mechanismů, které nejsou dosud přesně indentifikovány a jejichž role v patogenezi poškození renální tkáně dosud není detailně popsána.

Jedná se o studium imunitních dějů ve tkáni ledviny na genové úrovni na podkladě zkoumání molekulárních markerů (cytokinů, chemokinů, růstových faktorů) s cílem predikce individuální prognózy konkrétního pacienta. Autorka využila faktu, že ačkoli je obecně přijímáno, že některými cytokiny zprostředkovaný zánět způsobuje rozvoj buněčného poškození, intersticiální fibrózu a tubulární atrofii, tak zdaleka už není jasné, zda genetická variabilita cytokinů může předurčit náchylnost organismu k progresi nefropatie, resp. rejekci štěpu ledviny. Některé tyto genové polymorfismy byly již v minulosti identifikovány v in vitro studiích, autorka je nyní studovala v humánních podmínkách.

Disertační práce má 62 stran textu včetně příloh. V desetistránkovém úvodu je podán stručný teoretický úvod do problematiky, speciální pozornost je věnována tématu současného stavu genové analýzy parametrů progresu IgA nefropatie a chronické rejekce transplantované ledviny. Vlastní odborná část práce se týká příložených 4 publikací autorky v plném anglickém znění (všechny v časopisech s IF), které jsou volně komentovány v následujících 6 stranách komentáře.

Prvním cílem práce bylo hodnotit prognostickou roli vybraných molekulárních fenotypů, infiltrace mononukleárních buněk do ledviny a klinických a histologických nálezů u 51 pacientů s biopsicky verifikovanou IgA nefropatií, kteří byli nadále prospektivně sledováni po dobu 24 měsíců. Pacienti byli podle zhoršení renální funkce v tomto období (danou hladinou sérového kretininu) rozděleni na progredující a neprogredující a byly porovnány korelace genových transkripcí TGF- β 1, HGFm BMP7, MCP-1, RANTES a monomolekulárního infiltrátu s progresí nefropatie. Autorka zjistila, že progresi IgA nefropatie závisela na závažnosti chron. vaskulopatie a na síle exprese genu pro TGF- β 1.

Druhým cílem práce bylo hodnotit intrarenální genové exprese vybraných cytokinů u pacientů s diagnostikovanou chronickou transplantací nefropatií. Studováno bylo celkem 74 biopsií transplantované ledviny (ať s přítomnou rejekční nefropatií či normálním nálezem). Autorka korelovala mRNA expresi výše uvedených cytokinů s histologickým nálezem a klinickými parametry. Uzavírá, že zjistila korelaci pro upregulaci exprese genu TGF- β 1, MCP-1 a dlouhodobě zhoršenou funkci štěpu a pro upregulaci cytokinů IL-10, TGF- β 1, IL-6, TNF- α , RANTES a akutní rejekcí štěpu.

Třetím cílem práce bylo najít vztah mezi vybranými genovými polymorfismy cytokinů a chemokinů na osud transplantované ledviny. Studováno bylo celkem 436 vzorků DNA pacientů, kteří podstoupili transplantaci ledviny. Byla provedena genotypizace 9 nukleotidových polymorfismů ve vztahu k incidenci rejekce. Autorka uzavírá, že žádný z funkčně relevantních polymorfismů v genech TNF- α , IFN- γ , CCR5, CCR2, TGF- β 1, MCP-1 a RANTES nezvyšuje riziko subklinické rejekce, akutní rejekce či CAN.

Disertační práce je zakončena závěrem, kde autorka ve třech bodech shrnuje dosažené výsledky. Disertační práce je doplněna literaturou s celkem 65 odkazy, většina z nich z recentních zdrojů. Na závěr je přiložen podrobný publikační seznam autorky.

Pokud jde o statistické hodnocení výsledků, v minulosti se přístup k asociačním studiím změnil a především zpřísnil s cílem eliminovat falešně pozitivní výsledky. Hlavním problémem obvykle byla nízká potřebná statistická síla testu, většinou z důvodu nízkého počtu jedinců zařazených do analýzy. Z pohledu předkládaných prací lze konstatovat, že studované soubory byly dostatečně velké, dobře charakterizované a reprezentativní.

Dále autorka dokládá spoji poměrně bohatou, ale především velmi kvalitní publikační aktivitu. Ze 13-ti přiložených článků bylo 12 publikováno v časopisech s IF, z toho 4 (kde je autorka 3x prvním autorem) jsou věnovány bezprostředně danému tématu práce. Součet IF těchto čtyřech publikací činí 11,3 a celkový IF přiložených publikací dosahuje velmi impresivní hodnoty 35,308. Taktéž citační ohlas prací dle SCI je vysoký – celkem činí 72

ohlasů. Dále je doložený H-index ve výši 5, což je mimořádně vysoké číslo u studentů doktorandského studia.

Autorka dále prezentovala svoje výsledky na celkem 31 zahraničních a 11 tuzemských kongresech. Všechny publikace byly provedeny v letech 2005-2010. Publikace jednoznačně ukazují, že oblast identifikace biomarkerů, pomocí kterých lze identifikovat nemocné v riziku progresu chronických glomerulopatií a komplikací po transplantaci ledviny, zvládla Ing. Brabcová do takové šíře i hloubky, že se stala významnou odbornicí. Publikace přispěly k dalšímu poznání a pochopení této problematiky.

Celkově lze konstatovat, že v předložené dizertační práci ing. Brabcová využívá svých zkušeností v problematice molekulární biologie a imunohistochemie, přičemž prezentuje nové dosud nepublikované využití těchto metod. Dizertační práce jasně formuluje své základní cíle, po stránce stylistické je psána dobrou češtinou, resp. angličtinou, je přehledná a srozumitelná. Publikace podrobně probírají zvolené téma z různých pohledů, globálních i specializovaných na různá podtémata a svědčí o dokonalém přehledu a osobní zkušenosti autorky v oblasti identifikace biomarkerů, pomocí kterých lze identifikovat nemocné v riziku progresu chronických glomerulopatií a komplikací po transplantaci ledviny. Všechny přiložené práce, jejichž je převážně první autorkou, byly publikované ve významných světových periodících s impact factorem či významných tuzemských časopisech.

Dotazy oponenta k obhajobě dizertační práce:

K předložené dizertační práci nemám žádnou závažnější kritickou připomínku, její odborná úroveň je vysoká. K obhajobě dizertační práce si dovoluji položit autorce následující otázky:

1/ příprava a technologické zpracování vzorků odebrané tkáně biopsie ledviny je kruciólní z pohledu další validity zjištěných výsledků, zejména z pohledu rizika možné časové prodlevy. Jak probíhal transport a zpracování vzorků? Jaká jsou obecná rizika chybné interpretace výsledků z hlediska technického zpracování vzorků?

2/ IgA nefropatie, alespoň ve svém počátku, je onemocněním primárně postihujícím glomeruly. Izolace RNA proběhla z homogenizované renální tkáně, tedy „směsi“ glomerulů a intesciia. V dnešní době jsou k dispozici již techniky pracující pouze s tkání glomerulární. Pokud by proběhla analýza pouze tkáně glomerulů, lze očekávat vyšší výtěžnost a specifitu výsledků?

3/ autorka zjistila korelaci mezi progresí IgA nefropatie a závažností chronické vaskulopatie, resp. síle exprese genu pro TGF- β 1 (stěžejního pro rozvoj fibrotických změn).

Současně však jako klinická proměnná (variable) byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p=0,05$) ve věku pacientů (progredující byli výrazně starší – průměr 55,6 vs. 38,9 r.). Nemohl se věk pacientů tedy výrazněji podílet na progresi nefropatie?

4/ podobně i systolický TK byl zjištěn na hranici signifikance ($p=0,07$) mezi oběma skupinami. Většina pacientů s glomerulopatiemi je takřka obligatorně léčena blokátory renin-angiotensinového systému (ACE-i, ARB) a to nezávisle na přítomnosti hypertenze. Je dobře známo, že tyto preparáty ovlivňují fibrotické změny, tedy i progresi nefropatie. Jsou známy bližší údaje o léčbě antihypertenzivy, resp. blokátory RAAS u sledovaných pacientů?

5/ výsledky studia genových polymorfismů jsou významně ovlivněny statistickou silou použitého statistického testu, čemuž autorka věnovala dostatečnou pozornost, vyšší než v dříve publikovaných studiích jiných autorů. Nicméně vliv vrozené predispozice na incidenci rejekce transplantované ledviny může být dále ovlivněn, resp. maskován, užíváním různé imunosuprese. Jak byl tento vliv testován, resp. eliminován v autorkou studovaném souboru?

Závěr:

Dizertační práce spolu s předloženými pracemi publikovanými ve významných světových časopisech ukazují, že v oblasti identifikace biomarkerů, pomocí kterých lze identifikovat nemocné v riziku progrese chronických glomerulopatií a komplikací po transplantaci ledviny, se uchazečka stala významnou odbornicí. Využívá přitom svých praktických zkušeností v oboru molekulární biologie a imunohistochemie, přičemž prezentuje nové dosud nepublikované využití těchto metod. Publikace, jejichž je autorkou či spoluautorkou, přispěly k dalšímu poznání a pochopení této problematiky.

Dizertační práce v předložené formě **splňuje**, resp. překračuje požadavky standardně kladené na dizertační práce, autorka **prokázala** schopnosti k samostatné tvořivé vědecké práci a proto **doporučuji** přijetí práce v předložené formě a na jejím základě doporučuji udělit Ing. Ireně Brabcové titul „Ph.D.“ za jménem.

V Praze dne 6.3.2011



Doc. MUDr. Ivan Rychlík, CSc., FASN

II. interní klinika 3.LF UK a FNKV

Šrobárova 50

100 34 Praha 10

tel./fax: 26716-2710

e-mail: rychlik@cesnet.cz