



Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Oponentský posudek

disertační práce Mgr. Aleny Fučíkové

Název práce:

Využití proteomické analýzy pro identifikaci potenciálních biomarkerů u onemocnění kardiovaskulárního systému

Pracoviště: Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany

Studijní program a obor: Infekční biologie

Školitel: PharmDr. Juraj Lenčo, PhD.

Vlastní text posudku:

Disertační práce vznikla na vysoce kvalitním pracovišti pod vedením zkušeného školitele. Pracoviště i školitel mají velké zkušenosti s řešenou problematikou, ve svém oboru patří nejenom k celorepublikové, ale i evropské špičce.

a) Kvalita disertační práce

Po formální stránce má disertační práce 149 stran textu, který je logicky a přehledně členěn podle obvyklého schématu. V úvodní části vymezuje řešenou oblast a nastoluje řešené otázky. Následuje teoretická část (str. 21 – 58), ve které autorka předkládá podrobný přehled problematiky týkající se analýzy krve, dále se věnuje přehledu používaných biomarkerů kardiovaskulárních onemocnění. Podává přehled poznatků o hypertrofické kardiomyopatii, kterou si zvolila jako model onemocnění, na kterém byla studie provedena. Věnuje se charakteristice onemocnění, otázkám genetického pozadí, dále podává přehled patofyziologických aspektů, klinického stavu, možností diagnostiky a terapie onemocnění. Podává přehled potenciálně zajímavých markerů pro diagnostiku onemocnění. V další části se zaměřuje na detailní přehled proteomických metod, se zaměřením na problematiku hmotnostní spektrometrie. Věnuje se jednotlivým komponentům hmotnostního spektrometru (iontovému zdroji, analyzátorům a detektorům). Dále podává přehled využití jednotlivých metodik, které byly zvoleny pro vlastní práci.

Cíle práce byly zvoleny logicky a reálně, autorka je formuluje velmi jasně a srozumitelně.

V experimentální části se autorka věnuje charakteristice použitého materiálu (včetně použitého přístrojového a programového vybavení), charakteristice kontrolní skupiny a souboru pacientů, zvoleným metodám.

Velmi kvalitní je část výsledků a diskuse, která zahrnuje po formální stránce strany 93 – 132.

Práce je zakončena závěrem, ve kterém autorka shrnuje dosažené výsledky, tyto zasazuje do klinického kontextu.

Celkově lze hodnotit kvalitu disertační práce jako velmi vysokou.



b) Aktuálnost tématu

Tématem disertační práce je využití metod proteomické analýzy při identifikaci potenciálně zajímavých biomarkerů hypertrofické kardiomyopatie.

Jde o vysoce aktuální téma, které vyplývá ze skutečnosti, že neexistuje jednoduchá screeningová metoda, která by byla schopna identifikovat nositele závažného onemocnění a mohla případně identifikovat osoby s tzv. maligní formou či rizikovým profilem onemocnění, které je příčinou náhlých úmrtí například v mladém věku.

c) Naplnění stanoveného cíle

Cílem práce bylo nalezení vhodné metodiky cílené proteomické analýzy pro potenciální proteinové markery hypertrofické kardiomyopatie.

Dalšími cíli práce bylo:

- určení kandidátních proteinů na základě srovnávacích experimentů a dříve publikovaných dat,
- tvorba SRM metody na vybrané proteiny,
- kvantifikace zvolených markerů pomocí SRM metody,
- ověření a porovnání výsledků pomocí jiných používaných metod.

Cíle práce byly zvoleny logicky a jasně. Výsledky studie naplnily všechny stanovené cíle.

d) Zvolené metody řešení

Metody pro řešení stanovených cílů byly zvoleny optimálně. Zahrnovaly výběr pacientů a kontrolní skupiny, zpracování vzorků krve pro proteomická stanovení a jednotlivé speciální metodiky pro provedení proteomických stanovení (detekce přítomných patogenů pomocí PCR, imunoafinitní odstranění vybraných proteinů plazmy pomocí HPLC kolony a centrifugačních kolonek, snížení koncentračního rozpětí pomocí hexapeptidové knihovny, enzymatické štěpení, LC.MALDI-MS/MS analýzu a identifikaci proteinů, iTRAQ mapovací studie, tvorbu vlastní SRM metody pro kvantitativní zhodnocení zastoupených markerů, optimalizaci a validaci kvantifikační SID-SRM-MS metody, přípravu vzorků s izotopicky značenými peptidy, kvantifikaci potenciálních proteinových markerů a ELISA stanovení vybraných markerů).

e) Výsledky disertační práce

Výsledky disertační práce jsou unikátní a i z hlediska světového písemnictví naprosto ojedinělé. Představují aplikaci nejpokročilejších metod proteomiky při identifikaci nových potenciálně zajímavých markerů nebezpečného onemocnění, kterým je hypertrofická kardiomyopatie.

Výsledky práce tvoří dvě hlavní kategorie. První je vytvoření a ověření metody cílené proteomické analýzy, která umožňuje sledování hladin vybraných a potenciálně zajímavých markerů hypertrofické kardiomyopatie a to během jedné časově náročné analýzy. Druhou oblastí je identifikace potenciálně zajímavých biomarkerů onemocnění, které by mohlo přispět k diagnostice onemocnění a při rizikové stratifikaci.

Přidanou hodnotou je identifikace některých doposud zcela neznámých působků, které mohou mít roli v patogenezi onemocnění.



Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

f) Vlastní přínos studenta pro teorii vědního oboru a praxi

Disertantka prokázala schopnost vysokého stupně samostatné práce na zvoleném tématu, které si osvojila, analyzovala současný stav poznatků o klinickém onemocnění a vypracovala metodiku k řešení stanovených cílů (viz výše). Disertační práce přinesla řadu nových poznatků, které jsou potenciálně významné pro prohloubení znalostí o patogenezi onemocnění, vytvořila a ověřila nové proteomické metody, které aplikovala v praxi, a přinesla poznatky, které jsou potenciálně využitelné v klinické praxi.

g) Publikační činnost studenta vztahující se k tématu disertační práce

Disertační práce obsahuje také přehled 4 publikací, které se vztahují k tématu, a kde byla disertantka spoluautorkou. Z těchto publikací byly 2 otištěny v časopise s tzv. impact factorem. Disertantka je také prvoautorkou publikací vztahujících se k tématu, které byly odeslány do tisku. Disertantka je prvoutorkou několika vědeckých sdělení, ve kterých prezentovala na domácích i zahraničních vědeckých konferencích výsledky své vědecké práce. Je také autorkou či spoluautorkou i dalších publikací z oblasti proteomiky.

Její publikační aktivita je na vysoké úrovni a zřetelně převyšuje průměr.

Závěr:

Pracovat na oponentuře disertační práce Mgr. Aleny Fučíkové bylo pro mne potěšením, neboť jde o práci se zajímavým tématem, velmi vhodně zvolenými cíli, odpovídající metodikou, kvalitním zpracováním výsledků, které obohatily studovaný obor, a s potenciálem přenosu některých poznatků do klinické praxe. Autorka prokázala, že má předpoklady k samostatné vědecké praxi, a proto doporučuji po úspěšné obhajobě udělení titulu Ph.D. podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

prof. MUDr. Radek Pudil, Ph.D.
I. interní kardiologická klinika
Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice
Sokolská 581
Hradec Králové
500 05

V Hradci Králové, dne 7. srpna 2013