

OPONENTSKÝ POSUDEK

**doktorské disertační práce Ing. Reginy Fillerové
vypracované na Ústavu imunologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého Olomouc**

s názvem

“Studium vybraných mediátorů zánětlivých a fibrotizačních procesů u pacientů s difúzními plicními nemocemi“

Disertační práce Ing. Reginy Fillerové byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Lékařská imunologie na Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci pod vedením Dr. Evy Kriegové.

Samotná práce má celkem 120 stran a je doprovázena seznamem prací publikovaných autorkou během studia. K samotné disertační práci se vztahují 4 původní práce publikované v časopisech s impakt faktorem, u jedné z nich je Ing. Fillerová prvním autorem a u ostatních spoluautorem. K předkládané disertační práci se také vztahuje přehledný článek publikovaný v recenzovaném časopise, kde je studentka také prvním autorem. Další dvě původní práce, vztahující se k disertační práci, u kterých je Ing. Fillerová prvním autorem, jsou rozpracované. Publikační aktivitu doktorandky pak dokládají další uvedené publikace u dalších nemocí se zánětlivou složkou (8 původních prací v časopisech s impakt faktorem, 1 práce v recenzovaném časopise, další původní práce v recenzním řízení), současně s řadou prezentací na národních/mezinárodních konferencích a celkovým počtem 181 citací (dle Web of Science).

Disertační práce vychází z výsledků autorky, je přehledně členěna do 9 základních částí a je názorně doprovázena řadou tabulek, obrázků a grafů. Seznam literatury tvoří 190 převážně recentních citací, což dokládá aktuálnost tématu, a uvedeny jsou rovněž publikace z vlastního pracoviště.

V úvodní části se autorka zabývá popisem difúzních plicních nemocí, zejména problematikou dvou nejčastějších z nich; sarkoidózou a idiopatickou plicní fibrózou. Autorka se věnuje popisu jejich etiopatogeneze a dále možnosti využití moderních molekulárně biologických metod k určení kandidátních molekul pro praktický odraz v diagnostice, prognózování a neposlední řadě i v terapii těchto onemocnění.

Cíle disertační práce pak vyplývají z této úvodní části a jsou jasně formulovány a členěny do šesti podjednotek, které se zaměřují na studium genových a proteinových expresních profilů vybraných kandidátních molekul účastnících se zánětlivých a profibrotizačních procesů u pacientů s difúzními plicními onemocněními.

V praktické části se autorka v každém ze šesti oddílů jednotlivě věnuje popisu dané problematiky zejména z pohledu molekulárně biologického, popisu použitých metod a samotným výsledkům. Z metodologického hlediska byly použity postupy založené na kvantitativní RT-PCR metodě pro stanovení mRNA exprese, proteinová exprese pak byla studována pomocí imunohistochemie a pomocí nové technologie, kombinující interakci antigen-protilátka a následnou detekci pomocí qPCR. Pro detekci vybraného polymorfismu u pacientů se sarkoidózou byla využita technologie MassArray, jež k detekci využívá hmotnostní spektrometrii. Také byla provedena funkční *ex vivo* studie pro stimulaci tvorby granulomů. Popis statistických metod použitých k hodnocení získaných výsledků je adekvátní a svědčí o zvládnutí i této části vědecké práce.

Výsledky jsou zpracovány poměrně obsáhle a jsou doprovázeny 13 tabulkami a 33 grafy/obrázky. V první části je identifikován stabilní referenční gen PSMB2 a RPL32 pro qRT-PCR studie v buňkách bronchoalveolární laváže, který do té doby nebyl popsán. V dalších částech autorka potvrdila klíčovou roli transkripčního faktoru T-bet v regulaci cytokin/chemokinové sítě u plicního zánětu u sarkoidózy a dále také potvrdila účast miRNA molekul na těchto procesech. Dalším klíčovým nálezem popsáným v následné části bylo potvrzení významné role transkripčního faktoru STAT3, esenciálního aktivátoru Th17 buněk, v indukci profibrotizačních změn v plicích. V neposlední řadě autorka popsala odlišné proteinové profily typické pro IPF a sarkoidózu a její klinické fenotypy, a to v séru i bronchoalveolární tekutině. Poslední část je věnována studiu polymorfismu ANXA11 rs1049550 a jeho vlivu na tvorbu granulomů u sarkoidózy.

Diskuze je uspořádána do podkapitol dle jednotlivých experimentů. Doktorandka komentuje dosažené výsledky a porovnává své nálezy a závěry s publikovanými údaji uvedenými ve světové literatuře, přičemž se snaží o zhodnocení svých dat i literárních údajů.

V závěrečném shrnutí jsou pak přehledně uvedeny nejdůležitější nálezy včetně možného využití získaných poznatků k pochopení příčin vzniku a průběhu onemocnění a možného terapeutického využití.

K práci mám následující dotazy:

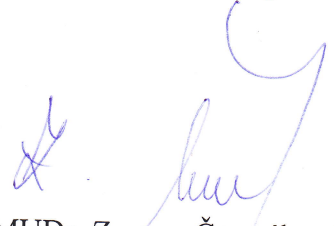
- 1) Jak si vysvětlujete funkční dopad ANXA11 polymorfismu na tvorbu granulomů? Jaké další molekuly se na tvorbě granulomů podílí?
- 2) Autorka v metodické části popisuje novou technologii kombinující klasickou interakci antigen-protilátka s detekcí pomocí PCR. Jaká je citlivost dané metody a jaké jsou výhody v porovnání s metodou ELISA?
- 3) Bude autorka pokračovat ve výzkumu dané problematiky? Pokud ano, jakým směrem?

Závěrečné hodnocení:

Autorka se ve své práci zaměřila na aktuální téma, k jehož řešení zvolila adekvátní metody, splnila stanovené cíle a přináší řadu originálních výsledků, jejichž význam i kvalita byly ověřeny publikacemi v časopisech s IF. Předložená práce odpovídá požadavkům na disertační práci, proto mohu konstatovat, že:

autorka předložené práce prokázala tvůrčí schopnosti a práce splnila požadavky kladené na disertační práci v oboru imunologie, a proto ji doporučuji k obhajobě a na základě obhajoby k udělení akademického titulu doktor, ve zkratce Ph.D. dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Ostravě, 15.5.2017


doc. MUDr. Zuzana Čermáková, Ph.D.
Přednostka Krevního centra FNO

Doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.,

Imunologický ústav, Lekárska Fakulta UK, Sasinkova 2, 811 08 Bratislava

Posudok na dizertačnú prácu

Autorka: Ing. Regina Fillerová

Názov: Studium vybraných mediátorů zánětlivých a fibrotizačních procesů u pacientů s difúzními plicními nemocemi

Dizertačná práca Ing. Reginy Fillerovej sa zaoberá najčastejšími difúznymi pľúcnymi chorobami – sarkoidózou a idiopatickou pľúcnou fibrózou, ktorých etiopatogenéza je veľmi komplexná a doteraz nie je objasnená.

Autorka vo svojej práci vychádzala z poznatku, že k pochopeniu etiopatogenézy týchto chorôb môže pomôcť sledovanie kľúčových génov a mediátorov, ktoré sa na rozvoji chorôb podieľajú. Preto sa v práci zamerala na štúdium vybraných mediátorov zápalových a fibrotizačných procesov u týchto chorôb. Študovala vhodné referenčné gény, úlohu Th1 transkripčného faktora, tiež molekúl, ktoré sa podieľajú Th17 imunitnej odpovedi, cytokínovú a chemokínovú sieť a ich transkripčnú a postranskripčnú reguláciu a funkčný dopad polymorfizmu v géne pre annexin 11 (rs1049550, ANXA11). Okrem toho súčasne hľadala vhodné biomarkery, ktoré by mohli slúžiť k prognózovaniu a sledovaniu odpovede na liečbu. Využila k tomu najmodernejšie molekulárno-biologické a proteomické metodiky.

Práca je napísaná kvalitne a zrozumiteľne na 131 stranách a je vhodne zdokumentovaná 12 tabuľkami a 39 obrázkami. Samotná práca je členená do šiestich kapitol, za ktorými nasleduje zoznam skratiek, použitá literatúra a nakoniec abstrakty a publikácie autorky. Autorka vo svojej práci získala zaujímavé výsledky, ktoré publikovala v karentových časopisoch a v časopisoch s impakt faktorom.

Cenným výsledkom bolo dokázanie zvýšenej expresie Th1 transkripčného faktoru T-bet u sarkoidózy a tiež korelácia jeho expresie s expresiou IFN- γ a CXCR3 a ďalších kľúčových molekúl Th1 imunitnej odpovede, ktoré majú úlohu v patogenéze sarkoidózy. U progredujúcej sarkoidózy zistili zvýšenú expresiu transkripčného faktoru STAT-3, ktorý je kľúčovým regulátorom Th17 imunitnej odpovede. Okrem toho sa u pacientov s progresiou choroby imunohistochemicky dokázala prítomnosť STAT-3 a IL-17 proteínu v alveolárnych makrofágoch, v tkanivových histiocytoch aj v lymfocytoch. Získané údaje podporujú kľúčovú úlohu Th1 a Th17 imunitnej odpovede

v etiopatogenéze sarkoidózy a tiež vplyv Th1 transkripčného faktoru na reguláciu cytokínovej a chemokínovej siete.

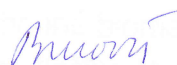
Autorka so svojimi spolupracovníkmi ako prví popísali mikro RNA profil v bunkách tekutiny z BAL u sarkoidózy, čo doteraz vo svetovom písomníctve nebolo publikované. Veľmi cenný je aj dôkaz funkčného dopadu polymorfizmu rs1049550 v géne ANXA11 na tvorbu granulómov u sarkoidózy.

V práci sa mi veľmi páčili aj výsledky s bunkami z tekutiny z BAL. Z teoretického prehľadu je jasné, že autorka sa dobre orientuje v danej problematike. Práca je napísaná kvalitne, precízne, má logické členenie ako aj veľmi logický postup pri stanovovaní jednotlivých dielčích cieľov, do ktorých bolo zapojených viacero pracovísk a ktorých vyriešenie poskytlo nakoniec komplexný pohľad na riešenú problematiku. Veľmi oceňujem kvalitné štatistické vyhodnotenie výsledkov a ich grafické spracovanie. Výsledky práce Ing. Reginy Fillerovej môžu prispieť k pochopeniu mechanizmov rozvoja zápalových a profibrotizačných procesov u pacientov s difúznymi pľúcnymi chorobami.

Záver:

Prácu Ing. Reginy Fillerovej odporúčam k obhajobe a na základe úspešnej obhajoby doporučujem, aby jej bol udelený akademický titul Ph.D.

V Bratislave, 28.4. 2017



doc. MUDr. Mária Bucová, CSc.