

Titl.

Děkanát Přírodovědecké fakulty UK v Praze,  
Albertov 6,  
121 43 Praha 2.

V Praze, dne 1.9.2011

Věc: Oponentský posudek na doktorskou disertační práci RNDr. Ingrid Hrachovinové,  
studijní program : Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie.

Název doktorské disertační práce RNDr. Ingrid Hrachovinové je

**P-selektin - nový protein v hemostáze.**

Cílem disertační práce bylo pokusit se dát odpověď na několik otázek:

1. Jakou roli hraje sP-sel při vzniku hyperkoagulačního stavu?
2. Co způsobuje hyperkoagulační stav?
3. Zda je receptor sP-sel zodpovědný za indukci exprese TF-MPs a MPs?
4. Zda je možné ovlivnit krvácivý stav aplikací vysoké dávky sP-sel?
5. Mohou být TF nebo TF-MPs být markerem závažnosti kardiovaskulárního onemocnění ?
6. Jaká je úloha TF- MPs a MPs v kardiovaskulárním onemocnění?

V tomto směru pak byly provedeny experimentální laboratorní práce autorky disertace.

V úvodu proto nejprve autorka disertační práce uvádí obsáhlý přehled o současném stavu znalostí z této problematiky.

...P-selektin je člen rodiny adhezivních receptorů selektinů, které se vážou na specifické cukerné zbytky glykoproteinů, např. v ligandu pro P-selektin na bílých krvinkách. Nachází v alfa-granulech krevních destiček a ve Weibel-Paladeho těliscích endotelových buněk. Při aktivaci buňky např. trombinem nebo histaminem je rychle translokován do plazmatické membrány, kde se účastní adheze leukocytů z krevního oběhu. P-sel sprostředkuje rolování leukocytů po povrchu aktivovaného endotelu a jejich extravazaci, což

je část obranného mechanismu organismu při zánětlivé reakci. V krevní plasmě lze také určovat koncentrace solubilní formy P-selektinu (sP-sel). Zvýšená hladina sP-sel byla nalezena u mnoha hyperkoagulačních a konsumpčních onemocnění hemostázy, jako např. u DIC (diseminovaná intravaskulární koagulace), TTP (trombotická trombocytopenická purpura) a HIT (heparinem indukovaná trombocytopenie). Zvýšená hladina však byla popsána u dalších onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, diabetes a hypertenze, které jsou spojeny s zánětlivou dysfunkcí endotelu a s aktivací krevních destiček. Bylo prokázáno, že zvýšená hladina sP-sel je rizikovým faktorem pro infarkt myokardu a iktus. To, že P-sel může hrát sám o sobě důležitou úlohu v hemostáze začala být evidentní při výzkumu transgenních myší, které neměly P-sel a byly u nich pozorovány krvácivé projevy. Vedle P-selektinu byla úvodní část věnována další složce hemostázy – tkáňovému faktoru (TF). O tomto glykoproteidu je známo, že se vyskytuje v tkáni mozku, srdce, ledvin, v děloze a placentě (jeho masivní uvolnění při porodu může vyvolat DIC sy) a v matrix cévní stěny. TF je hlavní iniciátor koagulační kaskády, kdy spolu s F VIIa aktivuje dále FX a FIX. Nyní se ukazuje, že existuje i tzv. „blood born TF“, což je forma aktivního TF, který je vázaný na mikropartikule (MPs). Tyto MPs s navázaným TF (TF-MPs) byly prokázány v krevních sraženinách a přítomnost TF-MPs je nutná pro správný a organizovaný růst krevní sraženiny. Předpokládá se, že většina TF-MPs pochází z apoptotických buněk, nebo naopak cirkulujících aktivovaných monocytů, endotelu apod. Velké množství TF-MPs bylo nalezeno v aterosklerotických placích. Tyto MPs jsou tvořeny lipoproteiny a fosfolipidy a jsou silně prokoagulační. Bylo prokázáno, že obsahují také větší koncentraci P-sel.

V experimentální práci pak Ingrid Hrachovinová se svými spolupracovnicemi podala jasný důkaz o tom, že P-selektin je významnou složkou hemostatického procesu (Andre, P., Hartwell, D., **Hrachovinova, I.**, Saffaripour, S., and Wagner, D.D. (2000) Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. PNAS. 97(25).13835-13840) a interakce mezi P-selektinem a ligandem pro P-selektin na granulocytech generuje prokoagulační mikropartikule, které korigují hypokoagulační stav u myší s hemofilií A (myší bez koagulačního faktoru FVIII) a navozují zde lokální tvorbu trombinu (**Hrachovinova, I.**, Cambien, B., Hafezi-Moghadam, A., Kappelmayer, J., Camphausen, RT., Widom, A., Xia, L., Kazazian, HH Jr, Schaub, RG., McEver, RP., Wagner, DD.(2003) Interaction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A. Nat Med., 9(8),1020-1025.). Tento poznatek by tedy mohl mít v budoucnu i klinický

význam při léčbě krvácivých příhod u hemofiliků, zejména pokud není možné použít rekombinantní formu FVIII, nebo jeho plasmatického derivátu.

V třetí publikované, nyní již klinicky zaměřené práci, byla autorkou disertace ( prováděla laboratorní vyšetření ) ve vzorcích krve získané po katetrizaci z koronárního sinu v l. komoře srdeční a v periferní žilní krvi u pacientů s akutním koronárním syndromem ( infarktem myokardu a nestabilní anginou pectoris) v porovnání s nálezy u nemocných se stabilní anginou pectoris a kontrolní skupiny pacientů s normálním koronárním angiogramem nalezena nižší koncentrace jak TF , tak mikropartikulí ( Maly, M., **Hrachovinova, I.**, Tomasov, P., Salaj, P., Hajek, P., Veselka, J.( 2009) Patients with acute coronary syndromes have low tissue factor activity and microparticle count, but normal concentration of tissue factor antigen in platelet free plasma : a pilot study. Eur.J.Haematol., 82(2), 148-153). Autoři předpokládají, že zde, pokud se jednalo o nemocné s vyšším rizikem a progresí koronárního syndromu, došlo ke konzumpci obou prokoagulačních složek. V diskusi však tyto nálezy hodnotí kriticky, vědomi si i jiného možného mechanismu. V každém případě je zde popsán jev, který ještě nebyl dříve pozorován. Připouštějí i vliv použitého heparinu a LMWH, které byly podávány jen pacientům s akutním koronárním sy.

Publikování výsledků disertační práce v prestižních vědeckých časopisech, dokazuje mimo jiné i to, že autorkou zvolený laboratorní postup, včetně výběru statistických metod odpovídá stávajícím požadavkům na kvalitu vědecké práce.

Dizertační práce je svým rozsahem stručná, obsahem nových poznatků je však velmi objevná, jak dokládají všechny 3 publikace výsledků studie v časopisech s celkovým IF 37,986 ( 25,43 + 9,771 + 2,785), které jsou uvedeny *in extenso* v textu disertační práce a další 2 publikace k tématu publikované v recenzovaných časopisech bez IF .

K práci mám ještě tyto otázky:

1. Mělo by význam stanovení sP-selektinu jako marker trombofilie?
2. Bylo již popsáno zvýšení mikropartikulí s TF u nemocných s trombembolickou chorobou, respektive byl nalezen rozdíl u nemocných s plicní embolií a izolovanou žilní trombózou ?

Závěr oponentského posudku:

Autorka disertační doktorské práce splnila hlavní cíle výzkumu a plně osvědčila, že je schopna samostatné vědecké práce při klinickém experimentu. Potvrzuje to i hodnocení její práce paní Dr.D.Wagner, vedoucí laboratoře Immune Disease Institute, Harvardské university, kde RNDr.Ingrid Hrachovinová samostatně prováděla některé experimentální studie věnované tématu disertační práce.

Doktorskou disertační práci proto hodnotím vysoce kladně a doporučuji, aby RNDr. Ingrid Hrachovinové byl po úspěšné obhajobě a správné odpovědi na kladené otázky udělen titul PhD za jménem.

Prof. MUDr. Jan Kvasnička DrSc.

1. interní klinika a Ústav klinické biochemie a  
laboratorní diagnostiky,

Centrální hematologická laboratoř a Trombotické  
Centrum, 1.LF UK v Praze

Příloha: disertační práce

1x zpět.