

Oponentský posudek disertační práce

„Význam S100 proteinů v patogenezi revmatických onemocnění“

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Autorka: Mgr. Lucie Andrés Cerezo

Školitel:

Doc. MUDr. Ladislav Šenolt, PhD.

Revmatologický ústav

Klinika revmatologie 1. LF UK

Na Slupi 4

128 50 Praha 2

Disertační práce Mgr. Lucie Andrés Cerezo se zabývá výzkumem role S100 proteinů v patogenezi revmatických onemocnění a jejich vztahem k aktivitě choroby.

Struktura disertační práce je založena na teoretickém úvodu, dokumentované vlastní výzkumné práci a přílohách 4 publikací vztahujících se k dané problematice. Vlastní text čítá 74 stran, 5 tabulek a 20 obrázků a grafů. Autorka uvádí k vlastnímu textu habilitační práce přes 130 citací. Text disertační práce je přehledný, je zvykle členěn na abstrakt, úvod, definici hypotéz a cílů práce, výsledky, diskuzi, použité zkratky, literaturu, seznamy publikací a přílohy.

V úvodu práce podává autorka rozbor současného stavu studované problematiky, shrnuje recentní názory na patogenezi revmatoidní artritidy (RA) s akcentem na synovitidu a molekulární mechanismy v synovii při zánětu. Věnuje pozornost také idiopatickým zánětlivým myopatiím- polymyozitidě a dermatomyozitidě. Další kapitola je věnovaná S100 proteinům, jejichž modifikovaná exprese byla dokumentovaná u mnoha onemocnění. Hlavní pozornost pak soustřeďuje na S100A12 (calgranulin C) a S100A8/9 (calprotectin) a zejména protein S100A4 (metastasin) spojovaný s nádorovými chorobami, ale také s autoimunitními poruchami. Metastazin představuje v rámci disertace hlavní zkoumaný protein.

Autorka definuje jasně cíle disertační práce, což je výzkum vztahu systémových hladin S100A4 proteinu k aktivitě RA, zhodnocení S100A4 role ve vztahu k zánětu u RA a určení molekulárních mechanismů vedoucích k S100A4 indukované imunitní odpovědi. Další cíle práce jsou zhodnocení významu S100A4 v patogenezi idiopatických zánětlivých myopatií a zhodnocení významu S100 alarminů u nemocných s časnou RA.

Výzkumná práce je rozdělena do několika okruhů:

1. Vyhodnocuje korelaci mezi sérovými hladinami S100A4 proteinu a aktivitou choroby, kterou prokazuje před nasazením TNFalfa terapie. Při terapii adalimumabem hladiny proteinu S100A4 signifikantně neklesaly, ale aplikace tohoto TNF inhibitoru vede k poklesu multimerní formy S100A4 ve prospěch dimerních forem proteinu. Jak dále autorka prokazuje, multimery stimulují lidské monocyty v tvorbě vyšších hladin cytokinu TNFalfa a mají tak z pohledu zánětlivé odpovědi větší význam.
2. Mgr. Cerezo se dále zabývá významem proteinu S100A4 u pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi. Prokazuje opět prozánětlivý účinek multimeru na mononukleární buňky izolované z periferní krve zdravých jedinců. Zjišťuje pomocí imunohistochemie významnou expresi S100A4 proteinu ve svalové tkáni pacientů se zánětlivými myopatiemi. Pomocí imunofluorescence pak zkoumá kolokalizaci proteinu s dalšími znaky (CD20, CD68, CD3, vimentin....etc).
3. U pacientů s ranou RA zkoumá korelaci snížení hladin sérového calprotectinu (S100A8/9) v závislosti na poklesu počtu oteklých kloubů (kontroly, před a po konvenční léčbě). Nalézají rovněž korelace s hladinami CRP a indexem aktivity DAS28.
4. Vyšetřuje molekulární mechanismy S100A4 indukované zánětlivé odpovědi ve vzorcích krve pacientů s RA. Izoluje monoklonální buňky periferní krve, stimuluje je S100A4 multimerem, S100A8, A100A12 a IgG. Selektuje CD3+T lymfocyty, tlumí v nich expresi genu S100A4, izoluje RNA, z ní získává reverzní transkripci cDNA a provádí analýzy genové exprese (TNF alfa, IL-1beta, IL-6 mRNA). Autorka zjišťuje indukci prozánětlivých cytokinů mononukleárními buňkami stimulovanými S100A4a prokazuje, že tato indukce je zprostředkována pomocí receptoru TLR-4 a aktivací NFkB, p38 a erk1/2 kináz.

Autorka kriticky hodnotí a diskutuje získané výsledky v kontextu existujících studií a hodnotí význam získaných poznatků.

Hodnocení: Jedná se o vysoce aktuální tematiku a vysoce kvalitní disertaci, jejíž výsledky a výsledky zařazených publikací jsou mnohdy prioritní ve světovém měřítku. Hypotéza je jasně formulována a cíle práce jsou správně definovány. Zvolené metody, velikosti zkoumaného souboru a zvolené statistické metody odpovídají cílům práce. Výsledky jsou přehledně formulovány. Práce je psána čtivým jazykem. Literatura je citována konzistentně dle přijímané konvence. Grafy a tabulky jsou přehledné a přehledně popsány. Závěry jsou jasně formulované a cíle práce jsou jednoznačně splněny. Autorka přispívá tvůrčím způsobem k poznatkům ve zpracované oblasti výzkumu. Jako první autor publikovala čtyři velmi pěkné publikace v časopisech s IF, je součástí týmu, který se danou problematikou intenzivně

zabývá. Autorka také publikovala řadu dalších publikací, z nichž mnohé s uvedeným tématem více či méně rovněž souvisejí. Je třeba rovněž ocenit technologickou pokročilost provedených prací a využití širokého spektra pokročilých laboratorních technik. Výsledky práce pomáhají osvětlit patogenetickou roli zkoumaných proteinů, poukazují na jejich potenciální praktické využití ve stratifikaci prognózy či aktivity choroby. Tyto nálezy se mohou rovněž podílet na definici nových léčebných cílů zkoumaných chorob.

K práci mám dva dotazy:

- a) Jak ovlivňuje expresi S100A4 terapie glukokortikoidy?
- b) Dle práce J. Klingelhöfera (Neoplasia. 2012 December; 14(12): 1260–1268) protilátky proti S100A4 suprimují tvorbu metastáz blokadou invaze buněk do stromatu. Existuje teoretická práce o využití protilátek proti S100 proteinům u autoimunitních chorob?

Závěr: Posuzovaná disertační práce obsahuje řadu cenných poznatků, které obohacují pohled na problematiku S100 proteinů a zejména na roli S100A4 u revmatoidní artritidy a idiopatických zánětlivých myopatií. Práce svědčí nejen pro její vynikající teoretické znalosti zkoumané problematiky, ale také pro schopnost aplikovat je v konkrétní situaci (sestavení souboru, volba metodik, schopnost interpretace výsledků). Tato práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji přijat ji v předložené formě komisí a na jejím základě po projednání, úspěšném absolvování oponentského řízení a splnění zákonných podmínek udělit titul PhD.

prof. MUDr. Pavel Horák, CSc. 

III. interní klinika FN a LF UP Olomouc

I.P.Pavlova 6

772 00 Olomouc

Olomouc, 27.5.2013