

Oponentský posudek

na doktorskou disertační práci **Mgr. Aleny Jiroutové** z Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UK V Hradci Králové.

Téma práce: **Vliv extracelulární matrix na expresi genů jaterních myofibroblastů**

Školitel: doc. RNDr. Jiří Kanta, CSc.

Aktuálnost zvoleného tématu

Snad nejlépe lze aktuálnost tématu vyjádřit názvem revuálního článku současného „papeže“ jaterní fibrózy SL. Friedmana: Liver fibrosis – from bench to bedside. (J Hepatol 2003; 38 (Suppl 1); pp. 38-53).

Ještě nedávno bylo pro klinického pracovníka konstatování jaterní fibrózy jen histologickým nálezem a pokud se při biopsii neprokázala uzlová přestavba, tedy jaterní cirhóza, nebyla takovému nálezu věnovaná prakticky žádná pozornost. Klinického pracovníka zajímala hlavně aktivita chronické hepatitidy, grading a stágin, tedy fibróza, jen v souvislosti s průkazem již cirhózy.

Jaterní cirhózou trpí v ČR asi 50 – 70 tisíc osob a ročně na cirhózu umírá asi 1500 – 2000 lidí. Pokud hovoříme o zlepšení zdravotní péče o takové nemocné, tak je to na jedné straně léčba až komplikací jaterní cirhózy a na opačné straně léčba stavů, které k chronickému zánětu vedou tj. zejména chronických virových hepatitid, chorob metabolických a toxo- nutritivních. Intermediární prostor, tedy jaterní fibróza moc nikoho nezajímala. Od laboratorních stolů k lůžku nemocného, to je to, co dělá jaterní fibrózu „horkým“ tématem dnešní hepatologie, propojení teoretických a klinických oborů, to je výzva. Z takového pohledu je předložená disertační práce aktuální, moderní, odpovídající teoretickým i klinickým trendům současné hepatologie.

Technické a formální parametry práce, její cíle a zvolené metody

Práce je napsaná na 82 stranách, včetně literatury, souhrnu a závěrů. Tabulek je 13, obrázků (barevných) je 12 a grafů 5. Všechny vhodně a instruktivně doplňují text. Ten je psán kultivovaným jazykem, některé anglicko-české obraty, například „upregulovaný“ nebo „downregulovaný“ odrážejí stav, kdy prakticky všechny odborné informace jsou čerpány z anglicky psané literatury a v jenom takové „prostředí“ se autorka pohybuje. Jde o práci experimentální, text je bez balastních slov a vět, a tím náročný, vyžadující soustředěné

studium a ne pouhé čtení. Je třeba vysoce ocenit, jak lehce si autorka s takovým textem poradila a to ve všech částech disertační práce, tj v úvodu do problematiky, při prezentaci výsledků a v diskusi. I to dokazuje, že studované problematice výborně rozumí a trvale a systematicky studuje její vývoj. Odpovídají tomu také literární odkazy. Je jich 153. Z nich jen 1/3 jsou dříve publikované než po roce 2000. Naší autoři jsou citováni 5krát a to prakticky jen v souvislosti se všeobecnými údaji. Autocitace jsou dvě. Školitel J. Kanta je citován 1krát. Důležitou součástí práce jsou tři přílohy. Jsou to tři vědecké publikace.

Alena Jiroutová et al. Expression of mRNAs related to connective tissue metabolism in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Experimental and toxicologic pathology* 58; 2007; 263-273; IF 0.755; GAČR 305/03/1513

Jiroutová et al. Collagenolytic potential of rat liver myofibroblasts. *Tissue Cell* (v recenzním řízení); IF 1.011; Grantová agentura UK 86/2006/C/LFHK a Grantová agentura MŠMT 00216220807

Alena Jiroutová et al. Expression of cytoskeletal proteins in hepatic stellate cells isolated from normal and cirrhotic rat liver. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005;48; 137-144.

V úvodu disertační práce, která je členěna klasici do tří částí, jsou vypsány její cíle.

- Izolovat hvězdicové buňky (HSC) a myofibroblasty (MF) z normálních a cirhotických jater potkanů.
- Popsat změny v expresi genů provázející aktivaci HSC a jejich přeměnu na MF a porovnat expresi genů HSC izolovaných ze zdravých jater a cirhotických jater potkanů.
- Zjistit, jak MF reagují na přítomnost trojrozměrné kolagenní a fibrinové matrix při kultivaci in vitro a popsat, zda a jakým způsobem to ovlivní jejich fenotyp.

Přehled současného stavu studované problematiky je napsán na 20 stranách, k tomu je však nutné ještě přidat anglický text z výše uvedených publikací. Autorka edukačně kvalitním jazykem rozvádí složité mechanismy vzniku jaterní fibrózy. Náročnost takového textu je mimo ostatní také proto, že výsledky experimentálních prací v této problematice, kterých je již mnoho, jsou často protichůdné. Každá nová taková práce, a předložená disertační práce takovou je, se stává důležitou součástí ani zdaleka nedokončené mosaiky patogeneze jaterní fibrózy.

Kromě historie a dalších základních informací autorka blíže popisuje myofibroblasty a jejich první popsany zdroj tj HSC, mechanismus jejich aktivace (iniciace, perpetuace, zánik), morfologii, imutocytochemickou charakteristiku a vliv kultivačního prostředí na HSC a MF.

Složení a degradace extracelulární matrix je další částí teoretického úvodu. Vyčerpávajícím úvodem do problematiky jsou jednoznačně zdůvodněny vytyčené cíle disertační práce, které jsou užitečné pro výzkum jaterní fibrózy.

Metodická část práce. Výzkumný projekt byl schválen odbornou komisí LF UK Hradec Králové. Pro experiment byli použiti samci potkanů Sprague.Dawley, u kterých byla jaterní cirhóza navozena tetrachlormethanem. V práci je detailně popsán postup izolace buněčné frakce obsahující HSC, jejich kultivace a kultivace MF, dále příprava kolagenního a fibrinového gelu, histologické zpracování tkáně, imunocytochemické vyšetření HSC a MF, izolace RNA, inkorporace značeného thymidinu do DNA dělicích se buněk, microarray analýza a validace výsledků arrayí pomocí rtRT-PCR.

Statistická analýza výsledků byla provedena programem NCSS 2004 (Number Cruncher Statistical System, USA). Přístrojové vybavení k realizaci experimentální práce bylo jednak Ústavu lékařské biochemie, ale i jiných výzkumných ústavů.

K metodice nemám co by oponent žádné připomínky. Navíc je jeho práce usnadněna s přihlédnutím, že metodiky jsou jednak obecně přijímané a jednak jsou také uvedeny v autorčiných recenzovaných publikacích s IF.

Výsledky a diskuse

- ✓ Byly izolovány HSC z normálních a cirhotických jater potkanů.
- ✓ HSC byly aktivovány na plastovém podkladu a byly prokázány jejich fenotypy klidové a aktivované fáze in vivo a in vitro.
- ✓ Studovány byly i MF, které se lišily od HSC morfologicky i imunocytochemicky.
- ✓ Klidové HSC vykazovaly oproti aktivovaným rozdílnost exprese genů pro extracelulární matrix. Jejich exprese z čerstvě izolovaných HSC jater cirhotických se blížila expresi HSC aktivovaných ale necirhotických.
- ✓ Nebyl prokázán rozdíl v expresi markerů (fibulin-2, proteoglykany a další) mezi MF cirhotickými a z necirhotických jater.
- ✓ Změny v expresi genů však mohou naznačit při srovnání MF a aktivovaných HSC, že jde o dva typy buněk s různou funkcí.
- ✓ Autorka prokázala, že fibrinový gel a zvláště gel tvořený kolagenem typu I podstatně ovlivňuje expresi genů MF..

V příkladné diskusi jsou vlastní výsledky a závěry střízlivě konfrontovány s výsledky řady podobných studií zahraničních. U nás se však jedná o studii originální.

Dotazy a připomínky

- Věcné připomínky nemám žádné
- Technické připomínky. V práci jsou jen drobné jazykové nepřesnosti, které jsou hluboce pod normou, než aby bylo třeba se o nich konkrétně zmiňovat. Jen snad text v tabulce č. 8 je uveden 2krát.
- Mám tyto dotazy
 - ✓ Myslí si autorka disertační práce, že proces fibrózy a pak i cirhotické přestavby je přirozenou, optimální reakcí na různá agens a pokud tomu tak není, kde je onen zlomový okamžik, kdy je fibrogenese ještě fyziologická a když již je patologická. Narážím nato, do jaké míry by případné ovlivnění fibrogenese bylo zdůvodnitelné a nebo je klíčové odstranění chronického agens. Na příklad u konsumentů alkoholu (pokud nejde o konzumaci překračující 150 g alkoholu denně) vznikne jaterní cirhóza pouze u jedné třetiny z nich.
 - ✓ Jsou podobné studie fibrogenese také u jiných parenchymatózní orgánů např. pankreatu?

Závěrečné zhodnocení

Doktorská disertační práce **Mgr. Aleny Jiroutové** jednoznačně **splnila** všechny stanovené cíle. Jde o **nadstandardně kvalitní experimentální studii**, jejíž výsledky jsou u nás originální a jsou obohacujícím vkladem pro experimentální i klinickou hepatologii. Proto **doporučuji práci k obhajobě** a na základě její úspěšnosti udělit Mgr. Aleně Jiroutkové vědeckou hodnost doktor ve zkratce **Ph.D.** dle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/95 Sb.

V Olomouci dne.2011-04-28

Prof. MUDr. Jiří Ehrmann, CSc.,

II. interní klinika – gastro – enterologická a hepatologická

LF a FN Olomouc

I.P.Pavlova 6 775 20

