

Oponentský posudek disertační práce:

MUDr. Barbora Lysá

Ovlivnění genové exprese u hyperproliferativních kožních onemocnění

Disertační práce MUDr. Barbory Lysé se zabývá účinkem léku imiquimodu (IQ) na expresi vybraných genů v průběhu léčby aktinické keratózy (AK) a na klinický průběh onemocnění. Autorka zvolila pro svoji práci aktuální téma, neboť IQ byl pro svoje imunomodulační (antivirové a antitumorózní) účinky klinicky testován v řadě indikací, avšak v České republice je registrován jako imunomodulans k léčbě condylomata accuminata a superficiálního bazocelulárního karcinomu. Autorka sledovala expresi 11 genů (a 1 srovnávacího genu- β -aktin), které rozdělila do 3 skupin: geny, které ovlivňují imunitní odpověď, geny podílející se na apoptóze buněk a geny, které hrají roli při vzniku nádorového onemocnění. Výsledky této práce prokázaly rozdílnou expresi genů, které kódují zánětlivé cytokíny, potlačení exprese antiapoptotických genů a nebyl prokázán žádný efekt na expresi genů zahrnutých ve vzniku nádorů. Klinické výsledky prokázaly úspěšnou léčbu AK u velké části pacientů (u 53,9% pacientů úplné vymizení AK, u 38,5% pacientů částečné vymizení ložisek AK). Význam práce spočívá zejména v příspěvku k objasnění podstaty účinku IQ, jehož mechanismus působení není dosud plně objasněn, zejména v souvislosti s terapií AK, ale i s možností dalšího terapeutického využití.

Disertační práce je předložena v klasické podobě, obsahuje 89 stran textu včetně tabulek, grafů a obrázků a je členěna do 3 částí: Literární úvod a přehled dané problematiky, Praktická část, ve které je stanoven cíl práce, materiál a metody, výsledky, diskuse a shrnutí a Závěr s uvedením seznamu literatury.

Výsledky práce autorka zhodnotila ve dvou publikacích v časopisech s významným IF (z toho je autorka jednou prvním autorem) ve spolupráci s pracovníky Kožní kliniky na Univerzitě Heinricha Heineho v Düsseldorfu a ve třech posterových sděleních.

Práce je zpracována přehledně s jasně stanoveným cílem a s využitím molekulárně genetických metod v souvislosti s posouzením klinických projevů onemocnění v průběhu léčby.

V úvodní části podává autorka podrobný přehled současných poznatků a je zřejmé, že se dokáže orientovat v řadě složitých procesů, které souvisejí se zkoumaným onemocněním a vybranými geny. Práci by prospěl seznam zkratk, který by umožnil lepší orientaci v dané problematice. V souvislosti s touto kapitolou mám 2 otázky:

1) V kapitole 1.4 Molekulárně genetická podstata nemelanomových kožních nádorů (str.20 vpravo dole) je tvrzení, že po genetické alteraci dochází ke vzniku klonální expanze postižených buněk, u kterých je pravděpodobnost dalších genetických změn vedoucích k růstu tumoru větší. Lze vysvětlit větší mutabilitu těchto buněk?

2) V kapitole 1.5.2 Tumorigenicita UV záření (str.28, odstavec vpravo nahore) je popsán transkripční faktor NF- κ B. Jak se liší protoonkogen *c-rel* od *v-rel*?

V praktické části autorka poskytuje základní informace o AK, možnostech léčby a účincích IQ. Navazuje kapitola 2.3, která by se měla jmenovat spíše Charakteristika sledovaných genových produktů, charakteristika genů není uvedena. V této části se na str. 35 vyskytuje poněkud nesrozumitelná věta: „Jeho gen (interferon- α) je kódován skupinou genů, které jsou lokalizovány...“ Co si pod tím představit? Jestliže se v lidském organismu vyskytuje 14 genů pro IFN- α , který z nich byl testován v této práci?

Následuje laboratorní část studie, která by si zasloužila podrobnější popis a i v této souvislosti mám několik otázek.

1) Byly primery uvedené v příloze 19 navoleny autorkou či byly převzaty z literatury?

2) Podmínky pro PCR byly pro všechny páry primerů stejné, tzn. pro všechny páry primerů lze použít stejnou anelační teplotu 56 °C? Je velký rozdíl v amplifikaci produktu jednoho genu, jestliže se počet cyklů liší o 1 cyklus?

3) Jak byla verifikována sekvence PCR produktu?

Kapitola Výsledky je zpracována přehledně jak po stránce klinické tak laboratorní s drobnými nedostatky. Předpokládám, že v přílohách 22 až 30 jsou v grafech na ose y vyneseny hodnoty poměru intenzity pruhů sledovaných genů k β -aktinu vynásobené 100, tak jak je uvedeno v následných tabulkách. V příloze 32 je v tabulkách uveden poměr (IFN- α / β -aktin)*100, ačkoliv je sledována exprese genu IL-6. Podobná chyba se vyskytuje ve všech dalších přílohách 33 až 41 včetně hodnot pro gen IL-6, ačkoliv jsou sledovány exprese dalších vytypovaných genů. Formální nedostatky se týkají několika jazykových „neobratností“, např. follow up cyklus (str.45), „zjištěna nereakce na léčbu apod., které však nesnižují kvalitu předložené práce.

Diskuse je vedena na dobré úrovni s využitím literárních údajů ke srovnání získaných výsledků a diskusi o nových dosud nepopsaných poznacích.

Na závěr bych ráda autorce položila ještě jednu otázku:

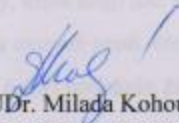
Lze na základě výsledků této práce nebo publikovaných údajů spekulovat o tom, v čem spočívá antitumorózní efekt imiquimodu?

Závěr:

MUDr. Barbora Lysá prokázala schopnost samostatné práce, schopnost stanovit cíle, kterých má být dosaženo, použít k tomu vhodné metody, analyzovat získané výsledky a diskutovat je v kontextu již publikovaných údajů. Práce rozšiřuje spektrum genů analyzovaných v průběhu aktinické keratózy a přispívá k objasňování mechanismu účinku léku imiquimodu a k možnosti ovlivnění průběhu patologických změn s možnou aplikací v praktické medicíně.

Vzhledem k uvedeným skutečnostem mohu konstatovat, že předložená disertační práce prokazuje předpoklady autorky k samostatné tvořivé vědecké práci a doporučuji proto, aby byla přijata jako podklad pro udělení vědecké hodnosti Ph.D.

V Praze 15.5.2007


Doc. MUDr. Milada Kohoutová, CSc.

Ústav biologie a lékařské genetiky I.LF UK a VFN