

# Oponentský posudek habilitační práce

**MUDr. Zuzana Havlíčková, Ph.D.**

Jeseniova Lekárska fakulta v Martine  
Univerzity Komenského  
V Bratislave

S názvem

## **Aktuálny pohľad na etiopatogenézu Crohnovej choroby v detskom veku**

**Oponent:**

Prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.

Dětská klinika

LF UP a FN v Olomouci

## 1. Rozbor práce

Habilitační práce MUDr. Zuzany Havličkové, Ph.D. o rozsahu 100 stran je tvořena úvodem, vlastními výsledky, které jsou dokumentovány grafy, obrázky a tabulkami, závěrem, rozsáhlým seznamem literatury a návrhem dalších perspektiv výzkumu. Dále jsou zde přiložené publikace autorky k tématu habilitační práce.

### Úvod

Přesná etiopatogeneze Crohnovy choroby (CD) není zcela jednoznačně objasněna, a to i přes veškeré úsilí výzkumu a přes poznání řady dílčích patogenetických mechanismů. Nedávná identifikace genu *CARD15/NOD2* se zvýšenou vnímavostí k CD představuje důležitý krok v imuno-patogenesi zánětlivého střevního onemocnění. Gen vysvětluje asi 20% genetické vnímavosti. *CARD15* mutace jsou přítomny u 30-50% pacientů s CD, ve srovnání se 7-20% u zdravých kontrol. Tři riziková alely R702W, G908R a 1007fsInsC v *NOD2*, které jsou asociované s vnímavostí k CD, prokázaly pozoruhodné množství heterogenity navzdory etnicitě obyvatelstva i regionálních rozdílů v celé Evropě.

V úvodu se autorka podrobně zabývá charakteristikou CD, heterogenitou fenotypových klinických projevů, etiologickými faktory CD, patogenesí CD. Samostatně je zde zmíněná problematika polymorfismu *NOD2/CARD15* genu u pediatrických pacientů s CD a význam oxidačního stresu v etiopatogeneze nespecifických střevních zánětech.

### Vlastní práce

Vlastní habilitační práce je věnována polymorfizmu *NOD2/CARD15* genu u pediatrických pacientů s Crohnovou chorobou dispenzarizovaných v gastroenterologické ambulanci Kliniky dětí a dorostu JLF UK a UNM v Martině. S cílem zjistit frekvenci výskytu alely 100fsInsC u dětských pacientů s CD v porovnání se zdravou populací, zjistit genotypovou i fenotypovou asociaci u nositelů alely 100fsInsC polymorfizmu *NOD2/CARD15* genu. Jedná se o prospektivní kohortovou studii, do níž se zapojila Klinika dětí a dorostu v M JLF v Martině.

Druhá klinická část habilitační práce se věnuje hodnocení peroxidace lipidů u pediatrických pacientů s nespecifickými střevními záněty.

**Cílem práce** bylo stanovit frekvenci výskytu rizikové alel 100fsInsC a zjistit genotypovou i fenotypovou asociaci u nositele alely. Prospektivní studie se zúčastnilo celkem 20 pacientů ve věku 2-18 let s potvrzenou Crohnovou chorobou podle kritérií ESPGHAN. Kontrolní skupinu tvořilo 20 zdravých jedinců přiměřeného věku i pohlaví, kteří byli hospitalizováni na Klinice dětí a dorostu v Martině pro úrazy a nezávažné akutní infekční onemocnění. U všech probandů studie byly pro Ústav lékařské biochemie JLF UK a UNM v Martině odebrány 4 ml nativní krve a po izolaci DNA komerčními kity *SiMax Genomic DNA extraction* (firma SBS) byla metodou PCR s použitím specifických primerů určována nepřítomnost mutace v obou alelách (wt/wt), heterozygotní genotyp (wt/mutace) a homozygotní mutovaný genotyp (mutace/mutace). Stanovení koncentrace 8-epi-prostaglandinu F2 $\alpha$  (8-izoprostanu) v moči bylo stanoveno pomocí enzymové imunoanalýzy podle doporučení výrobce (BIOTECH Urinary 8-epi-prostaglandin F2 $\alpha$ , OxisResearch, USA) na Ústavu klinické biochemie. Výsledky byly analyzovány pomocí statistického programu SYSTAT 11.0. Jednotlivé hodnoty byly porovnány s využitím Pearsonova chi-kvadrát testu.

**Výsledky** studie jsou ve skupině dětských pacientů s CD s mutovanou alelou soustředěny do souhrnné tabulky. U pacientů s alelou 100fsInsC byla zjištěna 40% nosičství (dva pacienti s homozygotní formou), ve skupině zdravých jedinců byl zaznamenán 25% výskyt. Nebyl potvrzen statistický významný rozdíl. Při hodnocení fenotypových projevů nosičů s rizikovou alelou bylo potvrzeno statisticky významné postižení tenkého střeva ( $p < 0,05$ ). Nedostatkem práce byl nízký počet probandů (v diskuzi uvádí sama autorka). Je na škodu, že se nezdařilo postavit národní multicentrickou studii, výsledky které by mohly splňovat geografický populační charakter.

Stanovení peroxidace lipidů pomocí komerčního testu na určení koncentrace 8-epi-prostaglandinu F2 $\alpha$  (8-izoprostanu) v moči bylo provedeno na kohortě 36 dětských pacientů s nespecifickým střevním zánětem (25 CD pacientů a 11 UC pacientů s ulcerózní kolitidou). Mezi zajímavé a prognosticky významné výsledky patřily signifikantně vyšší koncentrace močového 8-epi-prostaglandinu F2 $\alpha$  u pacientů s nepříznivým průběhem onemocnění (IBD  $p = 0,0005$ ; UC  $p = 0,04$ ; CD  $p = 0,02$ ), stejně jako pacienti s recidivou nemoci. Byla zaznamenána

mírná korelace hladin močového 8-epi-prostaglandinu a dávkou mesalazinu u pacientů s UC a dávkou azatioprinu u pacientů s CD.

V **diskusi** jsou shrnuty závěry a perspektivy dalšího výzkumu v oblasti diagnostiky a predikce nespecifických střevních zánětů u dětí. Význam genetického vyšetření dnes má již své místo při určení prognózy zejména u včasných forem pediatrických IBD a může se podílet na optimalizaci léčby těchto forem nepříznivého onemocnění. Získané výsledky jsou jistě limitovány malým počtem zařazených pacientů, ale i poměrně vysokým výskytem nosičství sledovaného polymorfizmu v kontrolní skupině zdravých jedinců.

### **Publikace autorky souvisejících s tématem habilitační práce**

Habilitační práce obsahuje přílohu vlastních publikací souvisejících s tématem práce, z nichž 1 práci z 3 publikovala MUDr. Havlíčková, Ph.D. jako hlavní autorka v zahraničních impaktovaných časopisech a 2 práce z 3 jako hlavní autorka v domácích recenzovaných časopisech.

### **Otázky oponenta habilitační práce:**

Přesný molekulární mechanismus *CARD15/NOD2* v imunitní odpovědi je nejasný, ale je známo, že hraje důležitou roli při zánětlivých onemocněních. Mutace genu *CARD15/NOD2* se uplatňuje v různých patologických procesech: Blauův syndrom (kožní vyrážka, kraniální neuropatie, granulomatózní artritida, uveitida), Crohnova choroba, psoriatická artritida a úmrtnost vázaná k transplantaci alogenních kmenových buněk.

**Otázka 1:** Při sledování různých fenotypových projevů CD v závislosti na přítomnosti rizikové alely 1000fsInsC jste extraintestinální manifestace ve svém souboru sledovali sumárně.

Vzhledem k výše uvedenému, nepozorovali jste u nositelů rizikové alely zvýšenou frekvenci artralgií nebo uveitid?

**Otázka 2:** Koncentrace močového 8-epi-prostaglandinu F2 $\alpha$  u pacientů s IBD dobře korelovaly s aktivitou onemocnění. Neporovnávali jste vy nebo někdo jiný korelaci hladin močového 8-epi-prostaglandinu F2 $\alpha$  s hodnotami fekálního kalprotektinu?

## **2. Souhrnné stanovisko k habilitační práci**

Habilitační práce a původní publikace autorky se zabývají zpracováním závažného tématu identifikace genu *CARD15/NOD2* se zvýšenou vnímavostí dětí k Crohnově nemoci. Za důležité považují potvrzení některých typických fenotypových vlastností u dětských nositelů alely 100fsInsC. Genotypová a genová diagnostika se stává standardem vyšetření dětských CD pacientů a pro svou prediktivní hodnotu může přispět k identifikaci vysoce rizikových pacientů a optimalizace léčebného postupu.

## **3. Závěrečné doporučení**

Habilitační práce MUDr. Zuzany Havlíčkové, Ph.D. odpovídá svým rozsahem, obsahem a nárokům kladeným na habilitační práci na Univerzitě Komenského v Bratislavě, a proto doporučuji její přijetí jako podklad pro habilitační řízení a na jejím základě jmenování MUDr. Zuzany Havlíčkové, Ph.D. docentem v oboru pediatrie.

17. 5. 2018

Prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.