

OPONENTSKÝ POSUDEK DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Andrea Málková: „Dermální expozice polycyklickým aromatickým uhlovodíkům“

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, doktorský studijní program
Hygiena, preventivní lékařství

Školitel: doc. MUDr. Lenka Borská, Ph.D.

Školitel konzultant: prof. Ing. Zdeněk Fiala, CSc.

Oponent: prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.

Obecná charakteristika práce

Disertační práce je napsána v českém jazyce. Obsahuje 133 stran textu a je členěna standardním způsobem na následující kapitoly: souhrn, teoretická část, cíle práce, experimentální část, metody a soubory nemocných, výsledky, diskuse, závěr, použitá literatura a přílohy. Strukturu práce a obsah jednotlivých kapitol práce považuji za vyvážený. Práce je logicky a přehledně napsána, výsledky jsou prezentovány v podobě řady názorných a dobře popsanych tabulek, obrázků a grafů a vyhodnoceny pomocí moderních statistických metod. Literární odkazy obsahují impozantní počet 272 publikací, v naprosté většině recentních.

Aktuálnost tématu

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou rizikovou skupinou chemických látek se širokým spektrem patogenity, kancerogenity a proinfekčních účinků. Jejich působení na lidské zdraví bylo již rozsáhle popsáno, ale vzhledem k velkému počtu derivátů není jejich spektrum ještě komplexně specifikováno. Zcela prokázané jsou jejich kancerogenní účinky u kuřáků, rozsáhle se studují jejich mutagenní účinky způsobené průmyslovou, emisní i domácí expozicí. Nejčastějším vstupem těchto kontaminantů do lidského organismu je cesta inhalační, orální a dermální. Struktura kůže a složitost její stavby omezuje vstup PAU do podkoží, do krve a do tukové tkáně, ale z fyziologické funkce kůže je jasné, že tento vstup nelze eliminovat. Doposud nebyly stanoveny objektivní hodnoty parametrů integrity epidermální membrány a integrity epidermální membrány je stále posuzována pouze vizuálně. Specifickou cestou dermálních expozic PAU představují terapie některých kožních onemocnění, např. Goeckermanova terapie psoriázy s využitím farmaceutického kamenouhelného dehtu obsahujícího vyšší koncentrace PAU. Na specifikaci míry zdravotních rizik této terapie se lékaři a výzkumníci prozatím plně neshodují a proto je nutné rozšiřovat kvalitativní i kvantitativní poznatky o trans-epidermální absorpci *in vitro* a současně i sledovat míru genotoxicity farmak na bázi kamenouhelného dehtu. Genotoxicita byla prozatím posuzována pouze testem chromozomálních aberací, který je sice tradičním testem, ale pouze s omezenou výpovědní hodnotou v případě adaptivní odpovědi a chromozomální nestability. Univerzálním testem genotoxicity je „cytokinesis-block mikronukleus test“ (CBMN), který umožňuje objektivní hodnocení poškození lidské DNA *in vivo*. Tento test je všeobecně používán pro svoji kvalitní validaci a relativní jednoduchost provedení i hodnocení. Autorka se ve své disertační práci věnovala jak studiu trans-epidermální absorpce, tak i studiu genotoxicity PAU a získala významné experimentální poznatky, které publikovala v mezinárodních časopisech. Aktuálnost studovaného tématu dokládá i rozsah publikovaných prací a jejich citovanost v mezinárodním měřítku.

Naplnění stanoveného cíle práce

Cíle předkládané disertační práce jsou směřovány do obou popsaných směrů bádání a to: posoudit rychlost a intenzitu prostupu PAU při trans-epidermální absorpci a objektivizovat míru genotoxicity PAU v rámci Goeckermanovy terapie u pacientů s psoriázou.

Teoretická část obsahuje popis chemických, fyzikálních, fyziologických, farmaceutických, toxických i kancerogenních vlastností PAU, jejich účinků na lidský organismus a metabolické změny. V první metabolické fázi jsou PAU transformovány pomocí enzymů na epoxidy a dioly, což je doloženo několika obrázky. V Obr. 4 (str. 20), který je poměrně nezřetelný, jsou vzorce BaP-7,8-diolu a BaP-7,8-katecholu stejné (proč autorka používá různé názvy?) a reakce vedoucí k BaP-o-chinonu je oxidace, nikoliv redukce, zpětná reakce je pak redukce a nikoliv oxidace. Dále je uveden popis metabolismu PAU v kůži, jsou zde specifikovány kožní transportní cesty a popsány jednotlivé typy transdermální absorpce včetně experimentálního uspořádání pro jejich testování. Velkou pozornost autorka věnuje popisu genotoxicity PAU včetně popisu strukturní reaktivity PAU s nukleotidy DNA. V Obr. 6 (str. 30) je znázorněna tvorba DNA adduktu, který ale obsahuje dvojvazný dusík v poloze 2-guanosinu, dále chybí hydroxyskupina v poloze 3'-ribo-2'-deoxyfuranosy. Mám otázku k informaci uvedené na str. 30, 4.ř. shora, jak mohou vznikat cis a trans DNA-addukty s diol-epoxidy PAU? V kapitole testování genotoxicity je podrobně popsán rozdíl mezi „mikronukleus test ve dvoujaderných buňkách“ a testem chromosomálních aberací včetně mnoha literárních odkazů na jejich aplikaci na periferních lymfocytech. Autorka se podrobně věnuje popisu psoriázy, charakterizuje její jednotlivé formy a její patogenezi se zřetelem na produkci tumor nekrotizujícího faktoru a interleukinu IL-32, které dále aktivují Th₁₇ a Tc₁₇ lymfocyty a produkují cytokiny a peptidy účastníci se zánětlivého procesu. Popisuje možnosti její léčby a modifikace Goeckermanovy terapie s fotochemoterapií, balneoterapií a thalassoterapií.

Experimentální část popisuje metodiku měření charakteristických parametrů transdermální absorpce, která byla provedena v souladu s mezinárodními normami na kůži z ušního boltce prasete. Vyhodnocení získaných dat a jejich statistické analýzy byly provedeny standardními postupy a základní kinetické charakteristiky dermální absorpce studovaných PAU „flux a lag time“ byly tabelovány u všech provedených experimentů (str. 54). Léčebná a genotoxická část popisuje aplikaci Goeckermanovy terapie u 173 pacientů trpících chronickou stabilní plakovitou formou psoriázy. Pacienti byli rozděleni do 4 skupin pro testy genotoxicity, u první skupiny byly provedeny testy CAT a MNT, u ostatních skupin test CAT. Obrázky na str. 49 a 50 dokumentují mikroskopickou analýzu, která byla použita pro genotoxické testy. V další části disertační práce jsou uvedeny charakteristiky jednotlivých skupin pacientů podle pohlaví, věku, postižení psoriázou, kuřáckých návyků, včetně doby léčby dehtem a UV záření a podrobných výsledků genotoxických testů.

Diskuse získaných výsledků je velmi kvalitní a autorka všechny své hodnoty porovnává s literárními údaji, pokud byly publikovány. Při hodnocení epidermální penetrace autorka našla vyšší hodnoty parametru „flux“ a nižší hodnoty parametru „lag time“ při nižším stupni variability dat oproti publikovaným hodnotám. Použití epidermální membrány by mohlo přinést přesnější výsledky při hodnocení zdravotního rizika dermální expozice PAU. Pro studium genotoxicity PAU autorka zavedla na svém pracovišti test CBMN a ověřila jeho funkčnost na popsaných skupinách pacientů. Výsledky testů prokázaly maximální genotoxicitu kombinované léčby psoriázy pomocí 4 %-ního farmaceutického dehtu a úzkopásmového UVB 311 nm záření. V případě použití širokopásmového zářiče UVA 320 – 400 nm byla genotoxicita nižší, ale rozdíl v účinnosti léčby byl zcela minimální a to 2% (str. 106). Výsledkem disertační práce je doporučení k aplikaci 4%-ního farmaceutického dehtu v kombinaci se širokopásmovým celotělovým zářičem pro léčbu psoriázy.

Oba cíle práce byly prostudovány na současné odborné úrovni pomocí mezinárodně aplikovaných experimentálních metod. Naměřené hodnoty byly statisticky vyhodnoceny a

prezentovány jako průměr s výběrovou směrodatnou odchylkou. Pomocí korelační analýzy byly nalezeny signifikantní korelace mezi studovanými parametry. Diskuse a závěry přináší konkrétní výsledky výzkumu a jejich aplikaci ve zdravotnictví. Disertační práce splnila zadané cíle v plném rozsahu a přispěla ke studiu transdermálních mechanismů polycyklických aromatických uhlovodíků a přinesla aplikovatelné poznatky o genotoxicitě klinické dermální aplikace farmaceutického dehtu v kombinaci s UV zářením.

Zvolené metody řešení

V obou popsanych směrech bádání byly použity metodiky, které jsou v souladu s mezinárodními normami. Použití epidermální membrány při studiu transdermální absorpce je perspektivní a může přinést přesnější výsledky při hodnocení zdravotního rizika dermální expozice PAU. Univerzálním testem genotoxicity je „cytokinesis-block mikronukleus test“ (CBMN), který umožňuje objektivní hodnocení poškození lidské DNA *in vivo*. Tento test je všeobecně používán pro svoji kvalitní validaci a relativní jednoduchost provedení i hodnocení.

Výsledky disertační práce

Výsledky disertační práce byly podrobně zhodnoceny již v předcházejícím textu a zde oceňuji zejména velký počet studovaných pacientů a porovnání jejich genotoxických parametrů, které výsledně přinášejí významné hodnocení zdravotních rizik při léčby psoriázy farmaceutickým dehtem v kombinaci s UV zářením. Konstatuji, že zavedení metodiky cytokinesis-block mikronukleus test“ umožnilo objektivní hodnocení poškození lidské DNA *in vivo* a autorka použitelnost tohoto testu plně ověřila. Výsledky a jejich využití při hodnocení zdravotních rizik expozicí PAU zcela naplnily zadání disertační práce.

Vlastní přínos disertační práce

Předložená disertační práce představuje významný vědecký přínos pro teorii a praxi této zdravotnické problematiky s ohledem na kancerogenitu a mutagenitu studovaných PAU. Výsledky genotoxických testů přispěly k hodnocení zdravotních rizik tradiční léčby psoriázy a umožnily zvýšit ochranu zdraví pacientů. Na tomto místě bych rád vyzdvihl výhody mezioborové spolupráce a význam i nutnost kooperace mezi složkami základního a aplikovaného výzkumu včetně léčebných zařízení.

Publikační aktivita studentky

Problematiku popisovanou v disertační práci studentka publikovala jednou jako první autor a sedmkrát jako spoluautor v osmi odborných člancích v časopisech s IF a dvakrát jako první autor ve dvou odborných člancích v časopisech bez IF. Přednesla tři přednášky na domácích konferencích a prezentovala jedno posterové sdělení na zahraniční konferenci. Publikační činnost studentky je dostatečná a svědčí o aktuálnosti tématu disertační práce, vhodnosti zvolených metod a důvěryhodnosti výsledků.

Nedostatky a chyby

V hodnocení disertační práci jsem nenalezl žádné vážné nedostatky či chyby. Dotazy uvedené v textu reagují na informace nalezené v textu práce a považuji za nutné je krátce vysvětlit a prodiskutovat. Jedná se pouze o nepodstatné chyby, nebo nepřesnosti, které nemají vliv na celkově velmi kvalitní disertační práci, která splňuje všechny požadavky kladené na její odbornou a vědeckou úroveň.

ZÁVĚR

Předložená doktorská disertační práce MUDr. Andrey Málkové splňuje všechny požadavky uvedené v § 47 vysokoškolského zákona č. 111/98 Sb. Jsem přesvědčen, že studentka prokázala způsobilost k samostatné vědecké práci, a proto doporučuji předložit disertační práci k obhajobě.

Dotazy:

- 1) Existuje studie porovnávající transdermální absorpci PAU lidskou a prasečí kůží, která by umožnila porovnání naměřených hodnot „flux a lag time“? Domnívám se, že prasečí kůže má podstatně jinou strukturu než lidská a proto průnik PAU by u lidí mohl být podstatně odlišný.
- 2) Byly popsány případy vzniku nějaké formy rakoviny po dlouhodobé aplikaci Goeckermanovy terapie psoriázy? V případě, že ano, jak dlouho trvala léčba psoriázy a jaká forma rakoviny se objevila.
- 3) Studium genotoxicity u kuřáků nebylo zcela v souladu s předpoklady výzkumu (str. 101). Autorka to vysvětluje dlouhodobou adaptací lidského organismu na zřejmě podprahové koncentrace genotoxických látek. Nebylo by možné tento poznatek využít při léčbě psoriázy?

prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
Katedra biologických a biochemických věd
Fakulta chemicko-technologická
Univerzita Pardubice
Pardubice 5. 8. 2019