

Oponentský posudek disertační práce Pharm. Dr. Doris Vokurkové:

Indukce apoptózy u hematopoetických buněk

Práce Pharm. Dr. Doris Vokurkové má za cíl studium indukce apoptózy u hematopoetických buněk v důsledku ozáření gama paprsky, respektive zářením X. Tento jev může být využit k určení dávky ionizujícího záření, kterou byl organismus zatížen a může tedy sloužit k předpovědi prognózy a volbě vhodných terapeutických intervencí.

Autorka použila obvyklé členění práce na kapitoly. Po úvodu následuje přehled současného stavu problematiky v rozsahu 7 stran. Je zde probrána historie léčby radiačních havárií, biologické základy postradiačních změn, klinická východiska jejich léčby, popsáno působení ionizujícího záření na buňku a význam apoptózy v postradiačním období. Tato teoretická část je napsána čtivě a přehledně. Autorka v ní prokázala velmi dobrou orientaci v problematice a znalost i moderní literatury týkajících se tématu.

V experimentální části jsou na počátku uvedeny cíle práce. Práce je zaměřena na sledování indukce apoptózy vyvolanou ionizujícím zářením u modelových leukemických linií HL 60 a MOLT 4, hematopoetických kmenových buněk a lidských lymfocytů získaných z periferní krve zdravých dárců.

Progenitorové buňky byly získány z periferní krve zdravých dárců po mobilizaci aplikací G-CSF pomocí separátoru, následně pak pomocí purifikačního systému MiniMACS a značeny použitím CD133 MicroBeads. Jejich čistota byla hodnocena pomocí flow-cytometru. Buňky byly poté kultivovány v Iscově modifikaci Dubelccova média. Mononukleární buňky byly z periferní krve izolovány pomocí centrifugace.

Leukemické linie byly ozařovány kobaltovým zdrojem v dávkovém rozmezí 0,2 – 20 Gy, PBMC dávkami 2-20Gy. Apoptotické buňky byly identifikovány flow-cytometrickou analýzou.

Expandované kmenové buňky krvetvorby byly ozářeny a následně vystaveny působení cytokinů SCF+IL-3+FLT3L. Byl sledován počet buněk, které vstoupily do buněčného cyklu v závislosti na dávce záření.

U kultivovaných lymfocytů izolovaných z periferní krve zdravých dárců a ozářených in vitro byly použity k testování použity Annexin V a propidium jodid. To umožnilo odlišit buňky časně a pozdně apoptotické a porovnat změny jejich počtu u skupiny neozářené a ozářené. Pro studium dávkové závislosti byly vybrány intervaly kultivace 16 a 48 hodin.

V části práce týkající se indukce apoptózy u lymfocytů po ozáření in vivo byla hodnocena odpověď NK buněk u nemocné ozařované pro karcinom hrdla děložního na oblast pánve a dutiny břišní X paprsky lineárního urychlovače. Dále byly sledovány pacientky ozařované pro gynekologické tumory na oblast pánve box technikou a nemocná ozařovaná celotělově pro hematologickou malignitu brzdícím svazkem urychlovače.

Výsledky práce ukazují, že všechny studované buněčné linie krvetvorby hynou po ozáření apoptózou. Vývoj počtu apoptotických buněk ve zvolených časových intervalech stanovený vybranými diagnostickými postupy je závislý na dávce záření. Stručně lze shrnout, že autorka řadou metod mapovala dynamiku postradiačních změn a prokázala vhodnost využití apoptózy jako markeru postradiačního poškození. Cíle, které si ve své práci stanovila tak byly splněny.

Práce je ilustrována řadou grafů. Z hlediska formální úpravy nemám zásadnější připomínky. Práce je na velmi dobré stylistické úrovni.

V seznamu použité literatury je uvedeno 67 publikací. Většina citovaných publikací je recentních.

Připomínky:

Určitým nedostatkem práce je to, že počty nemocných sloužících k hodnocení efektu ozáření byly malé. Pro rozsáhlejší studii však autorka zřejmě neměla technické podmínky. Vytknout lze i to, že výběr pacientů zřejmě zahrnoval osoby s aktivní nádorovou chorobou, což vedlo ke změnám v populaci NK buněk. Volba pacientů s adjuvantní radioterapií pro širší spektrum diagnóz bez přítomnosti klinicky prokazatelné nádorové populace by interpretaci usnadnila. Příklad nemocné ozařované v oblasti pánve a dutiny břišní ukazuje, že vhodné by bylo zvolit soubor pacientů ozařovaných velkoobjemově, s klinicky vyjádřenými změnami v krvetvorbě, což by mohlo být blízké situaci typické radiační havárie.

Celkově lze říci, že práci je možno považovat za velmi kvalitní a přínosnou pro pochopení a hodnocení postradiačních změn u hematopoetických buněk. Metodika práce byla adekvátní stanoveným cílům, autorka prokázala schopnost vědecky pracovat, získané výsledky správně interpretovat .

Závěrem lze říci, že předložená práce nepochybně splňuje požadavky na doktorandskou disertační práci.

v Pardubicích dne 1.2.2008

doc. MUDr. Jaroslav Vaňásek CSc.