

Oponentský posudek disertační práce

Název práce: Histochemické změny po účinku vysoce toxických inhibitorů cholinesteráz ve vybraných částech centrální a periferní nervové soustavy

Autor: MUDr. Petr Hájek

Ústav anatomie, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové

Oponent: prof.. MUDr. Jiří Kassa, CSc.

Předložená disertační práce MUDr. Petra Hájka se ve své první části zabývá vypracováním vlastní kvantitativní histochemické metody stanovení acetylcholinesterázy (AChE) v centrálním nervovém systému (CNS) a srovnáním této metody s klasickým biochemickým spektrofotometrickým stanovením aktivity AChE. V další části disertační práce je tato nově vyvinutá metoda využita k vyhodnocení inhibičního účinku zástupců vysoce toxických organofosforových sloučenin, zvaných nervově paralytické látky (NPL) ve vybraných částech mozku, k vyhodnocení profylaktického efektu selektivního inhibitoru AChE s centrálním účinkem Huperzinu A a ke srovnání reaktivační účinnosti terapeuticky podaných oximů (obidoxim, HI-6 a K048). Zvolené téma disertační práce považují za aktuální a potřebné, neboť i v současnosti přetrvává reálná hrozba zneužití těchto vysoce toxických látek nejen ve válečných konfliktech, ale i silami terorismu. Metoda kvantitativního histochemického stanovení aktivity AChE umožňující vyhodnocení vlivu jak vlastních toxických látek, tak profylaktických a terapeutických antidot na aktivitu AChE v přesně definovaných částech mozku je pro toxikologii organofosforových sloučenin velmi užitečná a perspektivní.

Za hlavní přínos disertační práce považují povýšení semikvantitativního histochemického hodnocení aktivity AChE po podání inhibitorů a reaktivátorů AChE na kvantitativní pomocí počítačové digitální analýzy obrazu, neboť toto hodnocení přináší na rozdíl od biochemického stanovení AChE daleko přesnější informace o heterogenitě aktivity AChE v mozku a o heterogenním centrálním účinku jak inhibitorů tak reaktivátorů AChE v důsledku jejich nerovnoměrné distribuce. Korelace této metody s klasickou biochemickou metodou stanovení aktivity AChE potvrdilo kompatibilitu obou metod s možností jejich vzájemného srovnání. Navíc tato metoda umožňuje při simultánním stanovení aktivity alkalické fosfatázy odlišení endoteliální AChE od neuronální AChE, což biochemické stanovení aktivity AChE nedokáže. Výsledky prezentované v disertační práci potvrdily heterogenitu aktivity AChE v CNS, nerovnoměrný centrální inhibiční účinek G i V látek v důsledku jejich nerovnoměrné distribuce v mozku, rozdíly v předchodu G a V látek přes HEB, významný profylaktický účinek Huperzinu A vůči G látkám (konkrétně vůči somanu) a rozdíly v reaktivačním účinku vybraných reaktivátorů AChE v CNS vůči tabunem inhibované AChE. Naopak nebyla prokázána u testovaných NPL a oximů predilekční inhibice či reaktivace AChE v medulárních respiračních centrech, kde je inhibice AChE považována z hlediska prognózy otravy za klíčovou. Nebyla prokázána ani vyšší prostupnost oximů v okolí cirkumventrikulárních struktur. Zcela okrajově byla řešena i problematika inhibice a reaktivace AChE na nervosvalových ploténkách bránice, ale vzhledem k absenci kvantitativního hodnocení jsou výsledky, týkající se příznivého působení Huperzinu A vůči somanu a účinnosti obidoximu vůči tabunu spíše hypotetické. Disertační práce splnila vytýčený cíl (vývoj kvantitativní histochemické metody stanovení aktivity AChE v CNS a ověření jejího přínosu při hodnocení inhibičního účinku vybraných NPL, protektivního účinku vybraného profylaktika a reaktivačního účinku vybraných oximů) v plném rozsahu.

Práce je z formálního hlediska členěna na úvodní, metodickou, výsledkovou a diskusní část, je velmi pečlivě zpracovaná s minimem překlepů a velmi dobrou grafikou. Po jazykové stránce je na dobré úrovni. Má všechny náležitosti, předepsané pro disertační práci.

K práci mám několik připomínek a doporučení, které však nijak zásadně nesnižují velmi dobrou úroveň disertační práce:

- Úvodní část disertační práce je vzhledem k jejímu celkovému rozsahu příliš rozsáhlá (zaujímá téměř 30% celé disertační práce). I když prakticky všechny uváděné údaje souvisejí s tématy disertační práce, měl být úvod napsán stručněji. Navíc se v literárním úvodu objevuje několik nepřesností: chybně je uvedena dávka pralidoximu v miligramech místo v gramech (str. 38), uváděné preparáty s trimedoximem (TMB4 comp., FOSAN) již neexistují, takže v ČR není trimedoxim k dispozici (str. 38), z hlediska terapie otrav NPL je v současnosti větším problémem terapie otravy tabunem než somanem, neboť zavedení oximu HI-6 významně zvýšilo účinnost antidotní terapie otravy somanem (str. 50).
- Ve metodické části práce týkající se hodnocení účinku Huperzinu A je chybně uveden objem, ve kterém byl i.p. podáván fyziologický roztok či Huperzin A - správně je 0,1 ml/100g (nikoliv 0,1 ml/kg)
- Ve výsledkové části práce týkající se změn aktivity AChE ve vybraných částech mozku po podání G látek (5.3.) chybí na rozdíl od V látek kvantitativní výsledky z histochemických preparátů, které by dokumentovaly tvrzení, že ve většině struktur byla zjištěna vyšší inhibice AChE po podání LD₅₀ G látek ve srovnání s V látkami.
- Ve výsledkové části práce týkající se hodnocení účinku antidot při otravě tabunem (5.6) postrádám tabulku s kvantitativním vyhodnocením reaktivačního potenciálu obidoximu ve vybraných částech mozku (jsou uvedeny pouze tabulky s účinkem oximu HI-6 a K048). Navíc v této části práce chybí i korelace histochemických výsledků s biochemickými.
- Poněkud problematické je vzhledem k počtu zvířat ve skupině statistické zpracování výsledků hodnotící statistickou významnost zjištěných rozdílů, čehož si je disertant vědom a v disertační práci vysvětluje, co ho vedlo k volbě tak malého počtu zvířat ve skupině. K verifikaci zjištěných statisticky významných rozdílů by nicméně bylo vhodné použít větší počty zvířat.

Na disertanta mám následující otázky:

- Jak došel disertant k dávce Huperzinu A 500 µg/kg při i.p. podání a jak riziková je tato dávka vzhledem k toxicitě Huperzinu A při daném způsobu podání.
- Jak si vysvětluje disertant zjevný rozpor mezi nízkou aktivitou AChE na nervosvalových ploténkách bránice po podání samotného Huperzinu A a aktivitou AChE srovnatelnou s kontrolní skupinou po kombinovaném podání Huperzinu A a somanu. Zajímalo by mě také, proč nebylo možné výsledky získané z bránice kvantifikovat a jestli to znamená, že nově vyvinutou metodu kvantitativní histochemie lze použít pro hodnocení účinku inhibitorů a reaktivátorů AChE pouze v CNS a nikoliv na periférii.

Závěr

Na základě celkového posouzení předložené disertační práce konstatuji, že předložená disertační práce prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci, o čemž svědčí i dosavadní publikační činnost autora. Proto doporučuji práci přijmout a připustit disertanta k obhajobě disertační práce.

V Hradci Králové 19. května 2008

prof. MUDr. Jiří Kassa, CSc.
FVZ UO Hradec Králové