

Oponentský posudek na disertační práci v doktorském studijním programu anatomie, histologie a embryologie MUDr. Petra Hájka:

„Histochemické změny po účinku vysoce toxických inhibitorů cholinesteráz ve vybraných částech centrální a periferní nervové soustavy.“ Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta Hradec Králové.

Základní identifikační údaje

Předložená disertační práce MUDr. Petra Hájka má celkem 117 stran a je standardně rozdělena do 8 kapitol: Úvod (1 strana), Literární přehled (41 stran), Cíle práce (2 strany), Materiál a metodika (8 stran), Výsledky (25 stran), Diskuze (11 stran), Závěry (2 strany), Použitá literatura (14 stran).

Textový část obsahuje 17 tabulek a 4 grafy. Obrazovou dokumentaci tvoří 18 mikro a makrofotografií velmi dobré kvality. Dokumentace je rozsáhlá a kvalitní.

Aktuálnost řešeného tématu

Autor se zabývá studiem změn aktivity některých enzymů po použití nervově paralytických látek a po účincích látek používaných k léčbě i profylaxi otrav nervově paralytickými látkami.

Tato tematika se stává v poslední době stále aktuálnější vzhledem k jejich použití v různých vojenských konfliktech nebo při teroristických útocích. Toto téma je tedy aktuální nejen z hlediska histochemického, ale i klinického resp. toxikologického, poněvadž by výsledky práce mohly přispět k vývoji co nejučinnějšího antidota s využitím pro léčbu i profylaxi otrav nervově paralytickými látkami.

Stručná charakteristika jednotlivých kapitol

V **úvodu** autor stručně definuje pojem nervově paralytické látky (NPL) a jejich účinky na metabolismus acetylcholinu. Konstatuje, že ačkoliv jsou NPL známy již více jak 70 let a také používány, nebylo dosud dosaženo uspokojivých výsledků ve vývoji antidota.

Dále pak stručně charakterizuje obsah disertační práce a zdůvodňuje použití vlastní vyvinuté metodiky kvantitativního hodnocení histochemických nálezů.

Literární přehled je velmi obsáhlý (téměř polovina celé práce). Je rozdělen do 6 podkapitol. Velmi podrobně popisuje metabolismus, funkci a lokalizaci acetylcholinu v organismu, zvláště v CNS; lokalizaci a funkci acetylcholinesterázy (ACHE), butyrylcholinesterázy, cholinacetyltransferázy i ostatních enzymů majících vztah k NPL.

V dalších podkapitolách se zabývá problematikou organofosfátů (OF) (organofosforových inhibitorů cholinesteráz). Ty nejučinnější se používají jako bojové chemické látky s označením NPL. Poukazuje na fakt, že se některé OF používají jako pesticidy. Dále pak vysvětluje úlohu reaktivátorů, které jsou schopny obnovit aktivitu ACHE.

Poměrně velkou pozornost autor věnuje problematice patofyziologie otravy organofosfáty a souvisejících histopatologických a histochemických změn. Zabývá se i vlivem heterogenity mozkových jader a s tím související heterogenitou účinku OF i reaktivátorů.

V podkapitole „Toxikologické a klinické aspekty“ autor vysvětluje pojmy toxická látka, střední letální koncentrace, střední letální dávka s dodatkem které dávky se podávají v experimentech, zjišťující účinek OF. Velmi podrobně pak popisuje problematiku akutní a chronické otravy OF včetně klinických příznaků. Závěr této podkapitoly je věnován diagnostice otrav, terapii a profylaxi. Autor se krátce zabývá i možnostmi využití inhibitorů cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy choroby, vaskulární demence, demence při Downově syndromu, demence s Lewyho tělísky a také využitím parasimpatomimetických účinků při léčbě glaukomu.

V podkapitole „Laboratorní metody průkazu aktivity ACHE“ se autor zabývá poměrně podrobně popisem histochemického průkazu ACHE známými metodami (Koelle-Friedenwald) a zejména Karnovsky-Roots, dále imunohistochemickým a biochemickým průkazem detekce aktivity ACHE. Zvláštní pozornost pak věnuje problematice kvantifikace aktivity enzymu v mikroskopických

preparátech. Popisuje vývoj metodiky kvantifikace od semikvantitativního hodnocení ve stupních nebo „křížcích“ až po moderní metodiku, která byla umožněna konstrukcí mikročipů a digitalizace. Kriticky hodnotí i možná úskalí metod kvantitativního hodnocení. Na základě prostudování prací renomovaných autorů pak dovozuje, že je možné provést seriózní kvantitativní hodnocení aktivity ACHE v mozku i posouzení toxického efektu.

V další podkapitole „Experimentální poznatky“ se zabývá úlohou potkana jako modelu pro otravu OF a problematikou somanu, jakožto nejúčinnější NPL. Celou rozsáhlou kapitolu literárního přehledu pak uzavírají podkapitoly týkající se použitelnosti antidota. Nakonec autor uvádí některé další dosud nezodpovězené otázky např. otravy stereoizomery OF, vstup OF do organismu různými cestami a problematiku dlouhodobé expozice nízkými dávkami OF. Z těchto údajů autor vychází při stanovení cílů práce.

Cílem práce je a) vypracovat vlastní metodiku kvantitativního stanovení ACHE v CNS a objektivizovat výsledky korelací s biochemickým vyšetřením b) popsat a kvantitativně vyhodnotit změny v aktivitě ACHE po působení základních představitelů NPL na vybraná jádra při akutní otravě c) využít metodu k ověření profylaktického účinku huperzinu A proti NPL d) pomocí kvantitativní histochemie prokázat účinek standardních i vyvíjených antidot na reaktivaci ACHE atakované tabunem včetně podrobného popisu inhibovaných mozkových oblastí e) vyšetřit aktivitu ACHE v jádrech retikulární formace považovaných za součást komplexu dýchacích center v oblongátě f) na základě reaktivity ACHE v různých částech mozku se pokusit o vyvození závěru o průchodu reaktivátorů hematoencefalickou bariérou g) prostudovat účinek zmíněných látek na nervosvalové ploténky bránice.

V kapitole **materiál a metodika** autor velmi podrobně popisuje pokusná zvířata, podmínky jejich chovu, použité chemikálie, způsob experimentální intoxikace a histologické zpracování tkáňových vzorků. Histochemické vyšetření ACHE bylo prováděno metodou Karnovsky-Roots, modifikovanou dle Lojdy. Detekce alkalické fosfatázy (AP) byla prováděna metodou dle Lojdy. Referenční řezy byly obarveny hematoxylinem-eosinem. Hodnocení preparátů bylo prováděno v OM Olympus s kamerovým systémem napojeným na počítač. Kvantifikace aktivity ACHE byla prováděna digitální analýzou obrazu. Statistické hodnocení bylo prováděno rovněž velmi pečlivě. Metodiku si autor ověřil na mozku zdravého potkana. Provedl rovněž korelaci s biochemickým vyšetřením. Celkově možno uvést, že kapitola materiál a metodika je zpracována velmi pečlivě do nejmenších podrobností.

Kapitola **Výsledky** je druhou nejrozsáhlejší částí práce. Je rozdělena ještě do dalších 9 podkapitol. Za nejvýznamnější výsledky pokládá následující:

- a) Byla vypracována metoda kvantitativní histochemie vhodná pro posouzení účinku NPL na nervový systém, účinku antidot a profylaktických látek proti NPL. Tato metoda korelovala se standardním biochemickým stanovením ACHE v mozkové tkáni a umožnila posoudit histochemické změny in situ.
- b) Bylo prokázáno, že střední letální dávky NPL snižují aktivitu ACHE ve strukturách CNS a byly nalezeny rozdíly v inhibici aktivity ACHE mezi jednotlivými NPL.
- c) Profylaktické využití huperzinu A bylo nejvýhodnější při intoxikaci G látkami (tabun, serin, cyklosin, soman), při intoxikaci RUX je tento efekt slabší nebo žádný.
- d) Byl prokázán reaktivační účinek obidoximu při otravě tabunem. Slabší účinek vykazovaly novější oximy (H1 – 6). Látka KO48 vykazovala slabý nebo žádný reaktivační účinek.
- e) při otravě NPL došlo k poklesu aktivity ACHE v bránici a i zde byl prokázán příznivý účinek huperzinu A při otravě somanem a obidoximu při otravě tabunem.

Uvedené výsledky verifikované kvantitativním vyšetřením budou mít význam pro léčbu otrav NPL. Získané nálezy pak autor v kapitole diskuze srovnává a konfrontuje s recentními nálezy autorů zabývajících se obdobnou tematikou.

Připomínky oponenta

K práci mám připomínky spíše formální.

- 1) Domnívám se, že by autor nemusel podrobně rozepisovat histochemické metody průkazu ACHE, neboť ty jsou již všeobecně známé již více jak 35 let.
- 2) Autor sděluje, že optická denzita závisí mimo jiné na tloušťce preparátu. Jakým způsobem byla změřena?
- 3) Při korelaci kvantitativní histochemie ACHE a biochemické metody byly problémy v oblasti, kde je aktivita ACHE nejvyšší (bazální ganglia), což autor vysvětluje větší tloušťkou řezu. Nebylo tedy možné použít tenčí řezy?

Závěrečné hodnocení

Doktorská disertační práce MUDr. Petra Hájka je zdařilá a v současné době, vzhledem k narůstajícímu terorizmu a množství lokálních konfliktů, kdy je možno počítat s použitím NPL velmi aktuální. Výsledky jeho práce mají význam nejen pro léčbu otrav NPL, ale i pro léčbu např. Alzheimerovy choroby. Oceňuji rovněž autorovu spolupráci s Katedrou toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové.

Práce je psána dobrou češtinou, překlepy jsem téměř nenašel (prosím jen aby autor nepoužíval termín nadledvinky – str. 29).

Množství prostudované literatury (178 položek v seznamu použité literatury) svědčí o tom, že autor zvládl nejen studovanou problematiku a metodiku, ale i hodnocení obsáhlých nálezů. Dokumentace je velmi dobré kvality. Autor použil adekvátní histochemické metody a postupy, včetně objektivizace výsledků pomocí moderních kvantitativních metod a statistického hodnocení výsledků.

Moje připomínky nikterak nesnižují hodnotu disertační práce.

Závěr: Práce splňuje podmínky § 47 zákona o vysokých školách 111/1998 Sb. a proto doporučuji, aby po úspěšné obhajobě byl MUDr. Petru Hájkovi udělen titul Ph.D.

V Olomouci 22.05. 2008

Prof. MUDr. Václav Lichnovský, DrSc.