

Posudek na disertační práci

MUDr. Aleš Homola

Difúzní parametry CNS u vybraných patologických stavů a buněčná terapie míšního poranění

K hodnocení jsem obdržel nejdříve disertační práci, která obsahovala 159 stran s větším množstvím formálních chyb, asi po 14 dnech mi byla zaslána druhá opravená verze v rozsahu 162, která byla doplněna o citace a kterou posuzuji.

Název disertační práce naznačuje na první pohled značnou tématickou heterogenitu, která však mizí při bližším obeznámení se s problémem ECP v CNS a buněčné terapie poškozené míchy. Disertační práce má dvě části. První, experimentální část má název „Difúzní parametry CNS u vybraných patologických stavů“, druhá část práce „Buněčná terapie míšního poranění“ má charakter klinické studie. Obě části mají podobné členění na úvod, otázky a cíle, metodiku, výsledky, diskuze a závěry. Následuje souhrn společný pro obě části disertační práce.

V první části disertační práce zabývající se difúzními parametry CNS u vybraných patologických stavů byla řešena na pracovišti prof. Sykové, které je v této oblasti světově uznávanou školou. Tématika je stále aktuální a představuje nové pohledy na extrasynaptické šíření signálů v CNS a jejich úlohu v normální a patologicky změněné nervové tkáni.

Po dobře a přehledně zpracovaném úvodu si autor disertace klade několik zásadních otázek, ke kterým se chce vyjádřit. Týkají se zejména difúzních parametrů extracelulárního prostoru (ECP) a energetického metabolismu během přechodné hypoxie a hypoxie/ischémie a studium ECP u gliových mozkových nádorů, v závislosti na různém stupni jejich malignity.

Vzhledem k výše uvedeným kvalitám pracoviště, je měření difúzních parametrů v experimentálních tkáních metodicky dobře zvládnuté a nemám připomínek.

Mám však zásadní připomínku k imunohistochemické (IHC) detekci glykoproteinů ECM. Při použití parafinových řezů, které se běžně používají v patologii, je častý problém revitalizace antigenů. Všeobecně se ustupuje od působení proteáz (trypsinu) a více se preferují jiné způsoby revitalizace např. působení mikrovln. Přestože ve firemních manuálech neustále přetrvává revitalizace epitopů natrávením proteázami a sám autor použil v práci pozitivní kontrolní tkáň, je nutné hodnotit výsledky IHC detekce ECM glykoproteinů po natrávení trypsinem velmi kriticky. *Dokáže autor říci jaký je mechanismus demaskování epitopů po působení trypsinu? A proč je hodnocení detekce příslušných ECM molekul po takovém působení značně problematické? Uvědomuje si autor souvislost použití trypsinu s pozorovanou difúzní IHC reakcí?*

Ve první části své práce uvádí doktorand řadu zajímavých výsledků, které jsou následně adekvátně diskutovány. U všech studovaných gliomů s výjimkou oligodendrogliomů byl objem ECP významně zvýšen. Navíc byla prokázána závislost mezi zvětšením objemu ECP a zvyšující se proliferací aktivitou gliomů. IHC detekce lamininu a studovaných kolagenů byla v analyzovaných gliomech prokázána zejména v místech přítomnosti cév, pouze tenascin a vitronektin byly detekovány v ECP. Zvětšení objemu ECP v gliomech bylo doprovázeno výrazným zvýšením tortuozity, která je způsobena buď tvorbou GFAP pozitivních výběžků u benigních gliomů nebo zvýšenou produkcí ECM molekul, zejména tenascin u malignějších nádorů.

Výsledky IHC detekce jsou velmi spoře ilustrovány, přičemž na obr. 11 je ilustrace detekce tenascin bez uvedení, z jakého materiálu obarvený řez pochází. Použitá protilátka proti tenascinu identifikuje jeho všechny isoformy, a je škoda, že autor nepoužil specifickou protilátku proti tenascinu-R, který má pro patologické procesy v CNS zásadní význam.

K první části dizertační práce mám ještě několik dalších drobných připomínek:

str. 26 – ad 1. nelze souhlasit s velmi nepřesným a matoucím vyjádřením k adhezi nádorových bb. k ECM – rovněž normální bb. včetně gliových mají kontakt se svou ECM, v ECM nádorových bb. dochází ke kvalitativním a kvantitativním změnám v molekulárním složení, - co se myslím vyjádřením ...*jednak dalšími proteiny asociovanými s integrity*. Integrity jsou receptory pro vazbu povrchu buňky s molekulami ECM.

Ad 2 - opět velmi nepřesné - *ECM podporují mitózu nádorových bb.*, navíc místo *mitogéza* – snad lépe mitóza

Ad 3 a 4 - opět nepřesné vyjádření – snad lepší vyjádření je, že molekulární složení ECM podporuje.....prodlužuje.....

str 48 - *antigen Ki67 není totožný s MIB-1* (protilátka), jak je chybně uvedeno v nadpise subkapitoly.

str. 87 – nemohu souhlasit s mechanistickým konstatováním v souvislosti s vysvětlením korelace koncentrace glutamátu a velikostí ECP, že*Je logické, že když poklesne objem ECP, vzrůstá koncentrace látek v něm obsažených....* Existují další mechanismy, které mohou souviset se změnami koncentrace molekul v ECP, změny v koncentraci molekul proto nemusí být přímo úměrné změnám ECP, jak je správně uvedeno dále v textu.

Kromě uvedených dílčích otázek mám ještě jeden obecný dotaz k první části diz. práce: Může doktorand komentovat proč gliové nádory CNS včetně těch nejinvasivnějších sporadicky

metastázuji mimo CNS na rozdíl od jiných typů solidních nádorů, které vykazují velmi časté metastázy právě do mozku, např. melanomy (až 40%) nebo plicní karcinomy (kolem 21%). Stručné vysvětlení uvedené na str. 16 není uspokojivé.

Druhá část disertační práce se zabývá aplikací autologních kmenových buněk (KB) kostní dřeně u míšních poranění. V této části byly vytčeny tři hlavní cíle: i/ zjistit, zda transplantace autologních kmenových buněk kostní dřeně je pro pacienty s poraněním míchy bezpečná a nevede ke komplikacím; ii/ stanovit optimální časový interval pro transplantaci; iii/ stanovit účinnost této terapie opakovaným vyšetřením implantovaných pacientů.

Je třeba upozornit, že k prvnímu cíli existuje již řada publikovaných a všeobecně akceptovaných poznatků o rizicích s odběrem a aplikací mesenchymálních KB při jejich použití v léčbě pacientů s hematologickými onemocněními. Lze proto považovat metodický přístup pro získání a aplikaci kmenových buněk za ověřený.

V úvodu druhé části disertační práce jsou velmi nekriticky citovány publikované výsledky preklinických a experimentálních studií, které údajně prokázali funkční reparaci poškozené míchy po aplikaci KB. Při znalosti složitosti uspořádání funkčních okruhů spojení míšních neuronů a současných metodických možností je nutné velmi kriticky hodnotit dosud publikované experimentální výsledky pozitivního působení aplikace KB na funkční reparaci poškozené míchy u laboratorních zvířat. Jde zejména o objektivizaci výsledků při odlišení spontánní regenerace a pozitivního vlivu KB.

V klinické studii uvedené v disertační práci byly KB aplikovány dvěma způsoby a to intravenózně do v. cubitalis a intraarteriálně do a. vertebralis. Všichni pacienti však byli před aplikací KB léčeni standardní chirurgickou léčbou, ***která však není v práci blíže specifikovaná.***

Do klinické studie s intravenózní aplikací KB bylo zapojeno 13 pacientů, přičemž ke zlepšení motorických funkcí došlo pouze u jedné pacientky. Lze však těžko posoudit, zda ke zlepšení došlo v důsledku neurochirurgické intervence a spontánního zlepšení nebo opravdu působením KB.

Všeobecně je známo, že významným metodickým problémem klinických studií zabývajících se léčbou poraněné míchy je hodnocení stupně jejího poškození a zejména průkazná diagnostika a fyzický důkaz totální transversální míšní léze (A). U pacientů s nižším stupněm (inkompletním) poranění míchy může docházet ke spontánnímu zlepšování stavu, tak jak to ukazují výsledky kontrolní skupiny pacientů v disertační práci. Ke zlepšení stavu došlo také u pacientů s inkompletním poraněním míchy pacientů zařazených do II. části klinické studie.

I přes kritické poznámky jsme přesvědčeni, že aplikace KB je v současné době pro léčbu míšních poranění stále nadějnou strategií a podobné klinické studie jsou potřebné při využití všech kriticky ověřených preklinických výsledků a zachování etických pravidel. V současné době nám stále chybí mnoho důležitých informací o mechanismech diferenciaci nových neuronů a jejich zapojení do maturovaných funkčních okruhů míchy, o nejvhodnější aplikaci KB a pod.

K závěrům dizertační práce mám ještě následující připomínku:

Jak jsem uvedl v úvodu svého posudku je tématická heterogenita disertační práce jen zdánlivá a je jen škoda, že doktorand v závěrečném souhrnu k oběma částem své dizertační práce více tuto skutečnost nezdůraznil a své výsledky lépe neposoudil v souvislostech.

Formální připomínky

Práce je psána dobrou češtinou a srozumitelným slohem. Překvapilo mne však, že při využití současné techniky obsahuje text větší množství překlepů. Dalším formálním nedostatkem textu je nejednotné použití desetinné čárky a *desetinné tečky*, která není v českém jazyce akceptovatelná.

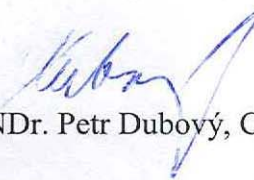
Publikace doktoranda

Autor uvádí 7 publikací souvisejících s tematikou disertační práce v kvalitních časopisech s IF, pouze v jednom případě je doktorand uveden jako první autor, ve zbývajících 6 publikacích je uveden na 2-4 místě.

Závěr

Dizertační práce vznikla na Ústavu neurověd 2. LF UK, ÚEM AV ČR, Spondylochirurgickém odd. a Neurologické klinice 2. LF UK ve FN Motol pod vedením uznávaných odborníků. Nehledě na výše uvedené nedostatky mohu konstatovat, že předložená disertační práce jednoznačně prokazuje schopnosti doktoranda (MUDr. Aleše Homoly) k samostatné vědecké práci, a proto doporučuji, aby mu byl po úspěšné obhajobě udělen titul Ph.D. podle § 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

V Brně 19. 8. 2008


Prof. RNDr. Petr Dubový, CSc.

Přednosta Anatomického ústavu LF MU